



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

Endoglucanase와 endoxylanase가 펄프의 특성과
셀룰로오스 나노피브릴 제조에 미치는 영향

**Effect of endoglucanase and endoxylanase on
characteristics of pulp
and production of cellulose nanofibrils**

2018년 8월

서울대학교 대학원
산림과학부 환경재료과학 전공
이 석 호

초 록

셀룰로오스 나노피브릴(셀룰로오스 nanofibrils, CNF)는 기계적인 힘을 가하여 제조한, 폭 100 nm이하, 길이 수 μm 이하의 나노셀룰로오스를 일컫는다. CNF는 높은 비 인장강도와 낮은 열팽창계수, 높은 비표면적, 친환경성과 생분해성등의 다양한 장점으로 많은 관심을 받아오고 있다.

CNF를 제조하는 방법은 펄프를 1~2% 지료로 준비하고 강한 기계적 전단력을 가하는 것인데, 나노화 과정까지 많은 에너지가 요구되기 때문에 이를 줄일 필요가 요구되어왔고, 여러 전처리 방법들을 통해 CNF의 제조에 필요한 에너지 소모를 줄이려는 노력이 시도되어왔다.

본 연구에서는 CNF 생산에 효소 전처리가 미치는 영향을 구명하고자 미건조 활엽수 표백 크래프트 펄프를 대상으로 endoglucanase와 endoxylanase 두 효소를 이용하여 전처리를 가하였을 때, 효소 전처리가 펄프의 특성과 나노피브릴화에 미치는 영향을 평가하였다. 전건 펄프 무게 대비 효소를 0.5 wt%, 효소 혼합비는 endoglucanase와 endoxylanase의 무게비를 100:0부터 0:100까지 6가지 조건으로 다르게 해서 전처리를 실시하였다. 펄프의 특성으로 섬유장, 여수도, 보수도, CED 점도, 화학적 조성비를 측정하였으며, 효소 전처리된 펄프를 그라인더와 호모게나이저를 이용하여 나노화를 실시하고 그 통과횟수별로 시료의 형태와 저전단 점도를 측정하여 나노화 양상을 살펴보았다.

효소를 단일 처리한 경우보다 혼합처리한 경우 펄프 특성에 있어 더 큰 변화가 있었다. 미세분 함량과 셀룰로오스 중합도가 감소하고 여수도와 보수도가 증가하였으며, 이는 단일효소 처리한 경우보다 혼합처리한 경우 더 많이 변화하였다. 펄프의 결정화도나 화학적 조성비는 효소 전처리에 의해 큰 영향을 받지 않았다. 각 효소 전처리 펄프를 그라인더를 이용하여 나노화하였을 때, 1% 농도 조건에서 CNF 현탁액은 무처리 펄프로 제조한 것보다 200~800 cPs 더 낮은 400~1000 cPs의 점도를 지녔다. 무처리 펄프는 CNF를 제조하기 위해 그라인더를 30번 통과하여야 했지만, 효소 전처리 펄프는 18번 그라인더를 통과하는 것만으로도 CNF로 분화되어, 더 적은 그라인더 통과횟수 즉, 적은 에너지로 CNF 제조가 가능하였다. 최종적으로 얻은 30번 그라인더를 통과한 CNF의 폭은

무처리 조건과 효소 전처리 조건 모두 20 nm 근처의 폭을 가진 것으로 나타났다.

각 효소 전처리 펄프들에 기계적 처리를 추가로 실시하였을 때, 효소 전처리 펄프가 단순 고해 전처리 펄프보다 미세분이 더 많이 발생하였다. 특히 endoxylanase의 배합비가 증가할수록 고해를 거치며 미세분이 더 많이 발생하였다. Endoenzyme을 함께 사용하여 전처리한 펄프는 고해를 거치면 효소전처리 없이 고해만 가한 펄프나 단일 효소 + 고해 펄프보다 더 높은 보수도를 가져 피브릴화가 더 많이 발생한 것으로 판단된다. 효소만으로 전처리된 펄프들은 호모게나이저를 이용하여 분화할 수 없었지만, 15분동안 추가로 고해를 가하면 부분적으로 호모게나이저를 이용하여 나노화가 가능하였다. 이렇게 얻은 CNF는 400~600 cPs의 점도를 지녔으며 20 nm의 평균 폭을 지녔다. 효소 전처리 펄프를 고해 후 그라인더를 이용하여 제조한 CNF는 최종적으로 그라인더 30번 통과 후 1% 현탁액 농도가 800~1500 cPs의 점도를 지녀, 같은 조건에서 고해를 거치지 않은 효소 전처리 펄프를 이용하여 제조한 CNF 현탁액보다 더 높은 점도를 지닌 CNF를 획득할 수 있었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 효소 전처리를 통해 CNF의 생산시 요구 에너지를 감소시키거나 최종적으로 획득하는 CNF의 물성을 조절할 수 있을 것으로 기대한다.

주요어 : 펄프, 효소, 고해, 셀룰로오스 나노피브릴, endoglucanase, endoxylanase

학 번 : 2016 - 26845

목 차

1. 서론	1
2. 연구사	3
2.1 나노셀룰로오스의 종류 및 응용가능성	3
2.2 전처리를 이용한 CNF 제조	4
2.3 펄프의 효소 전처리와 이를 이용한 나노셀룰로오스 제조	4
3. 재료 및 방법	7
3.1 공시재료	7
3.1.1 펄프	7
3.1.2 효소	7
3.1.3 완충용액	7
3.2 실험 방법	9
3.2.1 펄프 효소 전처리	9
3.2.1.1 Endoenzyme 혼합 전처리	9
3.2.1.2 효소와 고해의 병용 전처리	9
3.2.2 효소전처리 펄프의 특성 평가	10
3.2.2.1 섬유장	10
3.2.2.2 여수도	10
3.2.2.3 보수도	10
3.2.2.4 CED 점도	11
3.2.2.5 화학적 조성비	11
3.2.2.6 펄프 결정화도 분석	11
3.2.3 CNF 제조	12
3.2.3.1 그라인더를 이용한 CNF제조	12

3.2.3.2 고압 호모게나이저를 이용한 CNF제조	12
3.2.4 CNF 평가	14
3.2.4.1 CNF 형태	14
3.2.4.2 CNF 현탁액 점도	14
4. 결과 및 고찰	16
4.1 Endoenzyme 혼합 전처리의 영향	16
4.1.1 효소 전처리 수율	16
4.1.2 펄프 특성 평가	19
4.1.2.1 섬유장 및 미세분 함량	19
4.1.2.2 여수도	21
4.1.2.3 보수도	24
4.1.2.4 CED 점도	26
4.1.2.5 화학적 조성비	28
4.1.3 CNF의 특성 평가	29
4.1.3.1 CNF 현탁액 저전단 점도	29
4.1.3.2 CNF 형태	32
4.1.3.3 종횡비	36
4.2 Endoenzyme 혼합 전처리 후 고해 펄프	39
4.2.1 펄프 특성 평가	39
4.2.1.1 섬유장	39
4.2.1.2 여수도	41
4.2.1.3 보수도	43
4.2.1.4 결정화도	45
4.2.2 CNF의 특성 평가	48
4.2.2.1 전처리 펄프 별	
그라인더 및 호모게나이저 구동	48
4.2.2.2 CNF 현탁액 저전단 점도	48

4.2.2.3 CNF 형태	52
4.2.2.4 중형비	56
5. 결 론	59
6. 참고문헌	61
Abstract	68

List of Tables

Table 1 Specifications of endoglucanase	8
Table 2 Specifications of endoxylanase	8
Table 3 Chemical composition of endoenzyme-treated pulp at pH6 and pH7	28

List of Figures

Fig. 1. Pressure condition during the operation of high pressure homogenizer	13
Fig. 2. Yield of enzyme-treated pulp	17
Fig. 3. Monosaccharides in the filtrate of enzyme-treated pulp	18
Fig. 4. Fines content of endoenzyme-treated pulp	20
Fig. 5. Fiber length of endoenzyme-treated pulp	20
Fig. 6. Freeness of endoenzyme-treated pulp	23
Fig. 7. Water retention value of endoenzyme-treated pulp	25
Fig. 8. CED viscosity of endoenzyme-treated pulp	27
Fig. 9. Viscosity of CNF suspension prepared by grinder (pH 7)	31
Fig. 10. Viscosity of CNF suspension prepared by grinder (pH 6)	31
Fig. 11. SEM image of grinder at 18 passes number CNF	33
Fig. 12. SEM image of grinder at 30 passes number CNF	34
Fig. 13. Width of CNF prepared by grinder	35
Fig. 14. Sedimentation of CNF suspension prepared by grinder	37
Fig. 15. Aspect ratio of CNF	

calculated from gel point concentration	38
Fig. 16. Estimated CNF length prepared by grinder	38
Fig. 17. Fines content of endoenzyme-treated pulp	
by beating	40
Fig. 18. Fiber length of endoenzyme-treated pulp	
by beating	40
Fig. 19. Freeness of enzyme-pretreated pulp	
by beating	42
Fig. 20. Water retention value	
of enzyme-pretreated pulp by beating	44
Fig. 21. XRD spectrum of enzyme-pretreated pulp	46
Fig. 22. XRD spectrum of enzyme-pretreated pulp	
after beating	46
Fig. 23. Crystallinity of enzyme-pretreated pulp	
by beating	47
Fig. 24. Viscosity of CNF suspension prepared	
by grinder (enzyme + beating)	50
Fig. 25. Viscosity of CNF suspension prepared	
by homogenizer (enzyme + beating)	51
Fig. 26. SEM image of grinder	
at 30 passes number CNF (enzyme + beaten)	53
Fig. 27. SEM image of homogenizer	
at 25 passes number CNF (enzyme + beaten)	54
Fig. 28. Width of CNF prepared	
by grinder (enzyme + beaten)	55
Fig. 29. Width of CNF prepared	
by homogenizer (enzyme + beaten)	55

Fig. 30. Aspect ratio of CNF prepared by grinder	
(enzyme + beaten)	57
Fig. 31. Estimated CNF length produced with grinder	
(enzyme + beaten)	57
Fig. 32. Aspect ratio of CNF prepared	
by homogenizer (enzyme + beaten)	58
Fig. 33. Estimated CNF length prepared	
by homogenizer (enzyme + beaten)	58

1. 서 론

친환경 소재에 대한 관심이 증가하는 시대 분위기 속에서 자연에 가장 풍부하게 존재하는 셀룰로오스는 많은 관심을 받고 있다.^{1,2)} 셀룰로오스는 목재칩을 펄핑하여 얻은 표백펄프나 셀룰로오스 유도체 형태로 사용되어 왔다. 최근에는 셀룰로오스계 물질에서 얻을 수 있는 나노셀룰로오스에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 나노셀룰로오스는 폭이 100 nm 이하이고 길이가 수 마이크로미터인 높은 종횡비를 지닌 섬유상 물질이다. 나노셀룰로오스는 높은 비인장강도와 낮은 열팽창계수, 나노스케일의 크기, 높은 비표면적, 원료의 지속가능성등의 장점을 지니고 있다.³⁻⁶⁾

나노셀룰로오스는 그 생산 방법에 따라 크게 기계적 방법으로 제조되는 셀룰로오스 나노피브릴(cellulose nanofibrils, CNF)과 산 가수분해 방법으로 생산하는 셀룰로오스 나노크리스탈(cellulose nanocrystals, CNC), 박테리아를 이용해 생산하는 박테리아 셀룰로오스(bacterial cellulose, BC)로 나뉘는데, CNC는 제조과정에서 사용되는 화학물질에 대한 부담과 낮은 수율 및 낮은 종횡비로 인해, BC의 경우 균을 배양하는데 요구되는 환경을 조성하기 위해 필요한 높은 제조 단가와 낮은 생산성으로 인해 상대적으로 생산이 용이한 CNF가 크게 관심을 받고 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 그러나 CNF 또한 생산과정에서 기계적인 힘을 이용하면서 많은 양의 에너지를 사용한다.^{7, 11)} 이로 인해 CNF 제조 시 요구되는 에너지 소모를 줄여서 생산 단가를 낮출 필요성이 제기되어 왔으며, 이를 위해 나노화 전에 펄프에 전처리를 가하는 연구가 진행되어 왔다. CNF 제조를 위한 전처리로는 크게 기계적 전처리, TEMPO ((2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-yl)oxy) 산화 전처리나 카르복시메틸화(carboxymethylation) 등의 화학적 전처리, 효소를 이용한 생물학적인 전처리 방법으로 나눌 수 있다.¹¹⁻¹⁴⁾

목질계 원료에서 리그닌을 제거하여 얻는 표백펄프(bleached kraft pulp, BKP)는 낮은 생산 비용과 획득의 용이성으로 CNF를 획득하기 위한 주재료로 사용된다. 표백펄프는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스, 소량의

리그닌과 회분으로 구성되어 있는 비균질 복합체이다. 표백펄프에 대한 기계적, 화학적 및 생물학적 전처리는 이러한 복합체의 구조를 파괴하며, 이렇게 전처리된 펄프는 무처리 펄프보다 구조적 강도가 약하여, 동일한 기계적 충격을 가하였을 때 더 쉽게 분화가 된다. 기계적 전처리 방법은 펄프에 물리적 충격을 가하는 방법이다. 화학적 전처리 방법은 주로 셀룰로오스에 작용기를 도입하여 작용기간의 전기화학적 반발력으로 펄프의 분화를 용이하게 만들거나 화학물을 이용하여 펄프 구성성분을 손상시키는 방법이다. 화학적 전처리 방법은 화학약품 사용하기 때문에 약품 회수로 인한 추가 공정이나 오염물 배출에 대한 환경적인 부담이 있다. 효소 전처리는 균이 분비하는 효소를 사용하여 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스 등의 고분자를 저분자화한다.¹⁵⁾ 무처리펄프로 호모게나이저를 이용한 나노화 시 막힘이 발생하는 반면, 효소 전처리 펄프를 호모게나이저에 적용할 경우 펄프 섬유가 막히지 않고 펄프섬유를 더 쉽게 나노화 할 수 있다.¹⁴⁾

본 연구에서는 펄프에서 가장 큰 구성비를 차지하는 두가지 물질인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 기질로 하는 효소들을 혼합비를 달리하여 적용할 때, 펄프의 물성 및 나노화에 미치는 영향을 구명하고자 하였다. 본 연구에서 사용한 효소는 주로 비결정 영역에서 무작위 분해를 일으키는 endo 계열로, endoglucanase와 endoxylanase를 선정하여 그 효과를 살펴보았다.

2. 연구사

2.1 나노셀룰로오스의 종류 및 응용 가능성

나노셀룰로오스는 그 제조방법과 특성에 따라 셀룰로오스 나노피브릴, 셀룰로오스 나노크리스탈, 박테리아 셀룰로오스 세가지로 나뉜다.

셀룰로오스 나노피브릴(CNF)은 Herrick과 Turbak에 의해 처음 제조되었는데, 펄프 섬유를 전건 기준 1~2%로 물에 푼 현탁액을 준비한 후 그 라인더 등을 이용하여 현탁액에 강한 기계적인 전단력을 가하여 펄프를 더 작은 단위로 분화하여 제조한다.^{7, 16)}

Rånby는 펄프 섬유를 산 가수분해를 통해 비결정영역을 녹여버리고 원심분리를 통해 상등액상에 녹아있는 셀룰로오스 콜로이드를 제조하였는데, 이는 셀룰로오스 나노크리스탈(cellulose nanocrystal, CNC)의 원형으로 여겨진다. CNC는 높은 결정영역을 지니며, 중량비가 매우 낮은 것이 특징이다.⁸⁾

Grande 등은¹⁷⁾ 의해 셀룰로오스를 생산해내는 박테리아(*Acetobacter* sp.)의 배양액에 전분을 넣어 나노셀룰로오스를 획득하였다. 유사한 방법을 이용하여 박테리아 셀룰로오스(Bacterial cellulose, BC)를 제조할 수 있었다.^{9, 10)}

다양한 나노셀룰로오스 생산 방법이 있지만, 제조과정 중 사용되는 화학약품에 대한 부담과 수율, 생산성 및 획득하는 셀룰로오스의 형상에 따른 물성 변화 등으로 인해 각 생산 방법은 다른 관심을 받고 있다.^{8, 18)} CNF의 경우 CNC나 BC보다 생산성과 수율이 좋고, 펄프등을 활용하여 상대적으로 적은 부담으로 얻을 수 있다. 또, 다른 셀룰로오스를 포함한 물질을 사용하여 제조할 경우 최종적으로 얻게되는 나노셀룰로오스의 결정화도와 수율, 비표면적과 중량비 등의 물성은 달라진다.^{19, 20)}

CNF는 높은 비인장강도와 낮은 열팽창계수, 나노단위의 크기와 높은 중량비를 지녀 친환경적인 보강제로서 매력적인 성질을 나타낸다.^{3 - 6, 18)} 또,

열적 안정성과 나노스케일을 활용하여 CNF를 이용하여 제조한 필름의 경우 필름 내부의 공극이 거의 없기 때문에 투명성을 지녀 디스플레이 분야에 사용될 가능성을 지니고 있다.²¹⁾ 그 외에도 CNF를 증점제로 사용하거나, 배리어 특성을 이용한 포장분야로의 응용될 가능성이 있다. 또, 추가적인 화학 개질을 통한 다양한 물성 부가 및 활용의 가능성을 지니고 있다.²²⁾

2.2 전처리를 이용한 CNF 제조

펄프를 나노화하기 전에 전처리를 가하여 나노셀룰로오스로의 분화를 보조하는 방법이 많이 연구되어 왔다. 가장 기본적인 전처리 방법은 기계적 전처리이다.²³⁾ 사용 장비에 따라 CNF를 제조하는 과정에서 펄프로 인해 막힘이 발생하여 기기구동이 안되는데, 기계적 전처리를 통하여 이러한 현상을 해결할 수 있다.

화학적 전처리 중 널리 알려진 접근 방법은 TEMPO((2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl) 산화 전처리와 카르복시메틸화(carboxymethylation)가 있다.¹¹⁻¹³⁾ 이러한 전처리방법들은 셀룰로오스에 이온성을 부여하여 생기는 정전기적 반발력을 이용, 적은 에너지를 가하여도 펄프의 구조적 분화를 손쉽게 이루어 내는 방법이다. 효소는 당화 및 제지분야에서 펄핑, 표백, 종이의 물성 개선 등에 사용될 가능성을 보여왔는데, 펄프를 나노셀룰로오스의 주 소재로 사용되면서 효소전처리 펄프를 가지고 나노셀룰로오스를 제조하는 연구가 진행되고 있다.²⁴⁻²⁸⁾

2.3 펄프의 효소 전처리와 이를 이용한 나노셀룰로오스 제조

효소는 박테리아와 균의 분비물로서 대상 기질을 분해하는 역할을 한다.¹⁵⁾ 효소는 작용 기작에 따라 크게 endo-계열 효소와 exo-계열 효소

로 나눌 수 있다. endo-계열 효소는 고분자쇄 내에서 무작위 절단을 발생시키며 주로 비결정영역에서 작용을 하고, exo-계열 효소는 고분자쇄의 말단에서 그 작용을 하여 이합체 등의 모노머 혹은 저분자량 중합체를 만들며 결정영역도 분해할 수 있다.^{29 - 31)} 이러한 다양한 기작을 지닌 효소를 함께 사용할 경우 분해가 더 효율적으로 발생하는데, Ramos 등에 의하면 endoglucanase와 exoglucanase를 함께 사용하면 recalcitrant cellulose를 더 쉽게 분해할 수 있다.^{29, 41)}

효소의 활성화에 영향을 미치는 인자는 효소의 투입량, 온도, pH, 용매 내에서 시너지를 일으킬 수 있는 다른 효소나 효소의 활성을 저해하는 염소이온 등의 이온 존재 여부 등이 있으며, 대상 기질의 비 표면적 증가에 의한 기질에 대한 접근성 증가가 효소의 활성화에 직접적인 영향을 미치기도 한다.^{32 - 34)}

효소가 활성을 보이는 pH 와 온도범위는 효소마다 다르다. 각 효소는 고유의 활성 온도와 활성 pH 범위 내에서 활성을 보이며, 범위를 벗어나면 효소의 활동은 급격히 감소한다.^{32, 34)} 기질의 비표면적과 투입한 효소의 양등을 통해 효소의 기질에 대한 접근성이 영향을 받아 효소의 활성이 바뀐다.³⁴⁾

Wang 등은^{27, 28)} endoglucanase를 사용할 경우 더 균질하고 인장강도도 더 높은 CNF를 제조하는데 도움이 되었다는 보고를 하였다. 특히, endoglucanase 전처리를 할 경우 펄프의 중합도가 감소하며 더 낮은 중합도를 지닌 CNF를 제조할 수 있기 때문에, endoglucanase가 효소 전처리를 통한 CNF 생산 에너지 저감에서 큰 역할을 하지만, 너무 과한 양의 효소를 사용할 경우 CNF 섬유가 과하게 끊어질 수 있다고 보고하였다.

헤미셀룰로오스는 육탄당과 오탄당으로 구성된 고분자로 각 구성 당들을 기질로 하는 분해 효소들이 다르다. 따라서 균이나 박테리아가 분비하는 hemicellulase를 보면, 각각의 헤미셀룰로오스 성분을 기질로 하는 여러 효소들이 섞여 있다.¹⁰⁾ 그 중 endoxylanase는 헤미셀룰로오스를 공

격하여 자일로오스와 xylo-oligosaccharides 등을 생산한다.⁹⁾ Lei 등에 의하면, xylanase 처리 된 펄프는 펄프 섬유벽 내의 xylan을 분해하며, 이로 인해 섬유벽 내의 구조를 느슨하게 만든다.³⁵⁾ Hassan 등은 xylanase 처리를 가하여 더 넓은 폭을 지닌 CNF를 만들었다고 보고하였다.³⁶⁾

3. 재료 및 방법

3.1 공시재료

3.1.1 펄프

본 실험에서 사용한 펄프는 국내 M사에서 분양받은 미건조 활엽수 표백 크래프트 펄프를 사용하였다. 해당 펄프는 약 80%의 글루코오스와 약 18%의 자일로오스, 0.5% 이내의 회분 등으로 구성 되어있다.

3.1.2 효소

Endoglucanase는 덴마크 N사에서 제조된 제품을 사용하였다. 실제 cellulase는 약 2% 포함된 액상이며, 그 외 세부 특성은 Table 1에 나타내었다.

Endoxylanase로는 덴마크 N사에서 제조된 제품을 사용하였다. 실제 xylanase는 약 25% 포함된 액상이며, 세부 특성은 Table 2에 나타내었다.

3.1.3 완충용액

국내 S사에서 제조한 제일인산칼륨을 토대로 만든 pH 6 완충용액과 제일인산칼륨, 제이인삼나트륨, 나트륨이지드를 토대로 제조된 pH 7 완충용액을 구입하여 사용하였다.

Table 1 Properties of endoglucanase

	Value
Cellulase unit activity	4500 CNU-CA/g
Active pH at 25°C	5 – 9
Approximate density	1.08 g/ml

Table 2 Properties of endoxylanase

	Value
Endoxylanase unit activity	2500 AXU/g
Active pH at 25°C	4.5 – 6.5
Approximate density	1.15 g/ml

3.2 실험 방법

3.2.1 펄프 효소 전처리

3.2.1.1 Endoenzyme 혼합 전처리

효소 전처리는 전건 펄프 기준 100 g을 기준으로 진행하였다. 효소 투입량은 선행 실험을 통하여 정하였으며, 전건 펄프 대비 무게비로 0.5% 첨가하였다. 총 효소 투입량 내에서 endoglucanase와 endoxylanase를 무게비로 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100로 설정하였다.

본 실험에 사용한 두 효소의 활성 pH 범위는 상이하여, pH 6은 두 효소의 활성 범위에 속하고 pH 7은 endoxylanase의 활성 범위에 속하지 않는다. 실험에 앞서 pH 조건을 6과 7 두가지로 정하고, 실험 결과 비교에서 pH 7 조건이 pH 6 조건보다 더 큰 효소 활성 결과를 보이면 pH 7에서는 endoxylanase의 활성이 약할것이기 때문에 endoglucanase의 기여하는 바가 더 크다고 가정하였고, pH 6에서의 변화가 pH 7에서의 결과보다 더 큰 변화를 보이면 반대로 endoxylanase의 영향이 더 클것으로 기대하였다. 효소 전처리 시 증류수와 완충용액을 이용하여 펄프의 고형분 함량을 10%로 조절하였으며, 완충용액은 조건별로 10 ml씩 투입하였다. 효소 반응 시간은 선행 실험을 통하여 1 시간으로 정하였으며, 반응 동안 15분 간격으로 반죽하여 잘 혼합되도록 하였다. 효소 반응이 완료되면 펄프를 증류수로 희석한 후 15분간 끓이고 세척하였다. 또, 몇몇 조건의 효소전처리 전-후의 펄프 전건 질량을 확인하여 효소전처리 수율을 측정하였다.

3.2.1.2 효소와 고해의 병용 전처리

효소의 투입량과 효소 혼합비는 앞선 조건과 같이 전건펄프 질량 대비

총 투입 0.5%, 혼합비 조건 6가지로 pH 7 조건에서 효소 전처리한 펄프를 준비하였다. 이 효소전처리된 펄프를 고해하여 효소 및 고해 복합 전처리를 수행하였다. 고해는 실험실용 Valley beater를 사용하였다. 각 조건별 펄프를 1%로 14.5 L를 준비한 후 고해를 진행하였다. 총 15 분동안 고해를 하였으며 고해 중간에 7.5 분 고해 진행 후 약 1.5 L의 시료를 채취 후 고해를 이어서 진행하였다.

3.2.2 전처리 펄프의 특성 평가

3.2.2.1 섬유장

각 조건별 펄프들은 Kajaani FiberLab 섬유장 분석기를 사용하여 섬유장과 미세분을 측정하였다. 각 측정조건별 3회 반복 측정하였으며, 측정 시 펄프 섬유 3000 개 이상의 펄프섬유의 길이를 측정하여 길이평균 섬유장으로 제시하였다.

3.2.2.2 여수도

캐나다 표준 여수도 시험기를 사용하여 각 조건별 펄프의 여수도를 측정하였다. TAPPI method T 227 om-99에 의거하여 진행하였으며 각 조건별로 3반복 진행하였다.

3.2.2.3 보수도

전처리된 펄프의 보수도를 Scan-C 62:00를 참조하여 측정하였다. 각 조건별 펄프케이크를 조건별로 3개씩 준비한 후 3000g, $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 조건에서 15분동안 원심분리를 진행하였다. 그 후 각 펄프케이크를 건조 전 후의 무게를 측정하여 보수도를 구하였다. 건조 전 펄프케이크의 무게를

m_1 , 건조 후 펄프 케이크의 무게를 m_2 로 하였을 때 보수도는 Eq. [1]과 같다.

$$WRV(g/g) = \frac{m_1}{m_2} - 1 \quad \text{Eq. [1]}$$

3.2.2.4 CED 점도

효소가 작용하여 셀룰로오스 고분자의 중합도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각 조건별 펄프들의 Cupri ethylene diamine(CED) 점도를 측정하였다. TAPPI method T 230 om-99에 의거하여 각 전처리 펄프를 수초지로 준비하고 동결건조 후 기건상태로 준비하여 측정하였다. 측정 중 펄프를 CED 용액에 녹이기 위해 90분간 교반하였다. 각 3반복하여 각 전처리 펄프를 녹인 CED 용액이 흐르는 시간을 측정하여 점도를 구하였다. 각 점도계의 상수를 C, efflux time를 t, 펄프를 녹인 용액의 농도를 d로 하였을 때, 각 펄프의 점도는 Eq. [2]와 같다.

$$V \text{ (cPs)} = C * t * d \quad \text{Eq. [2]}$$

3.2.2.5 화학적 조성비

National renewable energy laboratory(NREL)에서 제시한 방법에 의거하여 각 전처리 펄프의 화학적 조성분을 측정하였다. 또, 효소 전처리로 발생한 단당과 올리고당을 측정하기 위해 세척과정에서 발생한 여과액을 HPLC를 이용하여 단당류를 분석하였다.

3.2.2.6 펄프 결정화도 분석

각 전처리 펄프를 IR pallet 제조기를 이용하여 압착한 후 X선 회절

분석기를 이용하여 결정화도를 측정하였다. 2θ 범위는 5~50 degree로 하여 측정하고, 세갈법을 이용하여 Eq. [3]과 같이 결정화도를 측정하였다. 여기서 I_{AM} 은 비결정영역에 해당하는 것으로 18°에서의 강도를 나타내며, I_{200} 은 22.7°에서의 값을 의미한다.

$$\text{Crystallinity}(\%) = \frac{I_{200} - I_{AM}}{I_{200}} * 100 \quad \text{Eq. [3]}$$

3.2.3 CNF 제조

3.2.3.1 그라인더를 이용한 CNF제조

각 전처리 펄프들을 증류수를 이용하여 고형분 함량 1.5%의 지료 4L를 준비하여, 그라인더(Masuko, Co., Japan)를 이용하여 CNF를 제조하였다. 스톤간의 갭 간격은 -80 μm 로 진행하였다. 스톤 회전속도는 1500 rpm으로 진행하였다. 그라인더 구동 중 3 회마다 시료를 채취하였다.

3.2.3.2 고압 호모게나이저를 이용한 CNF 제조

각 전처리 펄프들을 증류수를 이용하여 고형분 함량 1%의 지료 1L를 준비하여 고압균질기 (Panda plus, Gea, Italy)를 이용하여 CNF를 제조하였다. 구동 중 5 회 간격으로 시료를 약 40 mL 채취하였다. 준비한 지료 농도로 호모게나이징 시 초기에 높은 압력 조건에서 구동하면, 막힘이 발생하였기 때문에 갭 간격을 점진적으로 조절하여 압력을 올려 나갔다. 통과횟수별로 압력을 올린 조건은 Fig. 1과 같다.

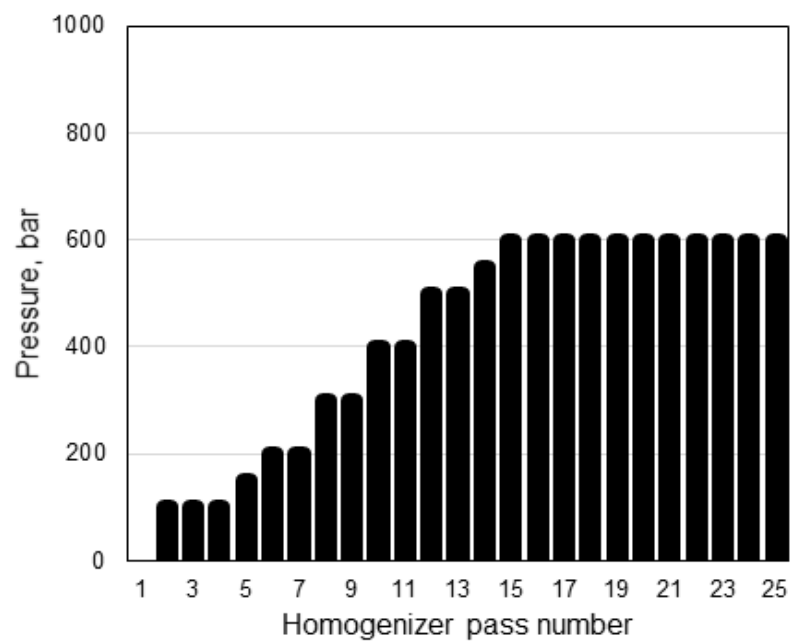


Fig. 1. Pressure condition during the operation of high pressure homogenizer.

3.2.4 CNF 특성 평가

3.2.4.1 CNF 형태학적 특성

제조한 CNF의 형태를 평가하기 위해 각 샘플별로 전자현미경을 이용하여 촬영하였다. 각 샘플을 진공탈수하여 CNF 시트를 제조한 후 용매치환을 진행하였다. 물과 에탄올 혼합비 70:30, 50:50, 30:70 그리고 0:100 순으로 각 조건별 용액에 4시간씩 정치시킨 후 아세톤에 12시간, n-헥산에 24시간 정치시켜 용매치환을 진행하였다. 그 후 백금코팅기를 이용하여 30 mA 조건에서 124초간 백금 코팅을 진행하였다. 그렇게 준비된 각 샘플들을 2 kV 조건에서 FE-SEM(Field-Emission Scanning Electron Microscope, SIGMA, carl zeiss, 영구)을 이용하여 CNF의 고배율 이미지를 얻고, CNF 형태를 관찰하였다.

같은 질량의 섬유상 물질을 침전시켜도 더 긴 종횡비를 지닌 섬유상 물질이 더 높은 침전높이를 보인다. Gourlay 등은³⁷⁾ 이를 이용하여 섬유상 물질의 현탁액을 침전시켜 gel point concentration를 구하면 이를 이용하여 섬유상 물질의 상대적인 종횡비를 구할수 있다고 보고하였다. 각 전처리별 gel point concentration를 측정하기 위해 샘플별로 0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%의 CNF현탁액을 준비한 후 48시간 침전하여 gel point를 측정하였다. 이를 이용하여 CNF의 상대적 종횡비를 추정하였다. 종횡비를 계산하는 공식은 Eq. [4] 같으며, A는 종횡비, g_c 는 gel point concentration, ρ 는 밀도를 의미한다. 본 실험에서 CNF의 밀도는 1.5로 계산하였다.

$$A = \sqrt{\frac{33\pi\rho}{4g_c}} \quad \text{Eq. [4]}$$

3.2.4.2 CNF현탁액의 점도

CNF 제조과정에서 얻은 CNF 현탁액을 1% 농도로 희석했다. 그 후 브룩필드 점도계(Brookfield Engineering Laboratories, USA)를 이용하여 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 저전단 점도를 3회 반복 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 Endoenzyme 혼합 전처리 펄프

4.1.1 효소 전처리 수율

pH 7에서 펄프 전건무게 대비 0.5%의 효소 전처리 시, 펄프의 구성물질 분해로 발생하는 손실결과를 가 분해될 때 발생하는 결과를 Fig. 2.에 나타내었다. 전체적으로 1%가 안되는 펄프 손실이 발생하였다. Fig. 3은 각 전처리 조건별 펄프 여과액에 존재하는 단당과 올리고당을 분석한 결과이다. 무처리펄프 여과액에는 극소량의 글루코오스와 자일로오스 단당이 존재하며, endoglucanase를 많이 투입할수록 더 많은 endoglucanase가, endoxylanase를 많이 투입할수록 더 많은 endoxylanase가 잡히는 것을 알 수 있다.

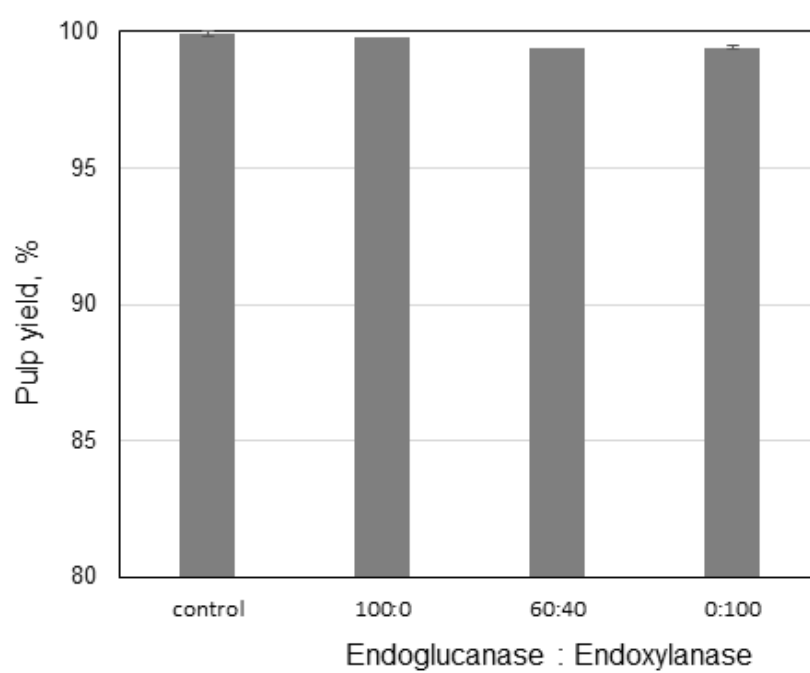
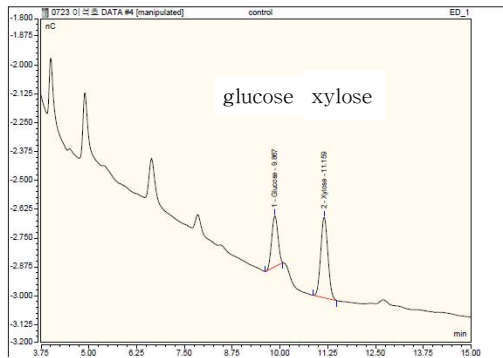


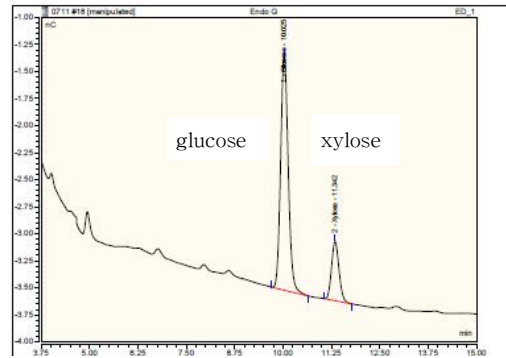
Fig. 2. Yield of enzyme-treated pulp.

No.	Time min	Peak Name	Peak Type	Area mC/min	Height mC	Amount ppm
1	9.87	Glucose	BMB	0.042	0.222	0.0361
2	11.16	Xylose	BMB	0.076	0.349	0.0893
TOTAL:				0.12	0.57	0.13



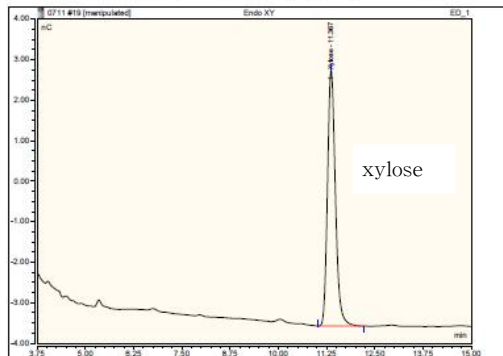
Control

No.	Time min	Peak Name	Peak Type	Area mC/min	Height mC	Amount ppm
1	10.03	Glucose	BMB	0.495	2.175	0.3524
2	11.34	Xylose	BMB	0.123	0.552	0.1188
TOTAL:				0.62	2.73	0.47



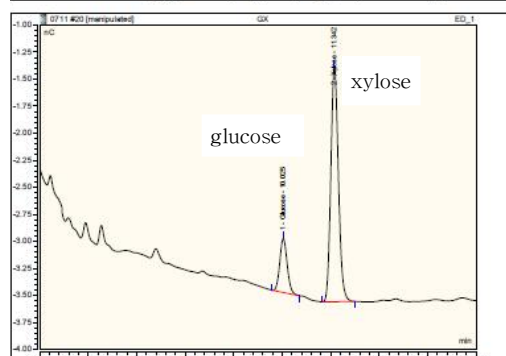
Endoglucanase 0.5%

No.	Time min	Peak Name	Peak Type	Area mC/min	Height mC	Amount ppm
1	11.37	Xylose	BMB	1.504	6.295	1.5155
TOTAL:				1.50	6.30	1.52



Endoxylanase 0.5%

No.	Time min	Peak Name	Peak Type	Area mC/min	Height mC	Amount ppm
1	10.03	Glucose	BMB	0.111	0.501	0.0777
2	11.34	Xylose	BMB	0.483	2.172	0.4819
TOTAL:				0.60	2.67	0.56



Endoglucanase 0.3%
+ Endoxylanase 0.2%

Fig. 3. Monosaccharides in the filtrate of enzyme-treated pulp.

4.1.2 펄프 특성 평가

본 실험에서는 펄프의 특성을 평가하기 위해 섬유장과 미세분, 여수도, 보수도, CED 점도, 화학적 조성비를 평가하였다. 효소 전처리가 펄프의 분해에 미치는 영향을 평가하기 위해 섬유장과 미세분을 측정하였고, 효소 전처리에 의한 미세분발생, 내-외부 피브릴화 및 단섬유화에 의한 복합적 물성 변화를 복합적으로 평가하기 위해 여수도와 보수도를 측정하였다. 효소의 활성에 의한 셀룰로오스 중합도 감소를 평가하기 위해 CED점도를 측정하였으며, 효소 전처리 후 펄프의 화학적 조성비 변화를 평가하기 위해 펄프와 효소 전처리 후 세척시 발생한 여과액의 화학적 조성비를 측정하였다.

4.1.2.1 섬유장 및 미세분 함량

Fig. 4와 Fig. 5에 나타났듯이 효소 전처리 펄프는 점선으로 표기한 무처리펄프의 6%대의 미세분함량보다 더 적은 3~4%의 미세분 함량을 나타내었다. 미세분이 감소하였기 때문에 효소 전처리 펄프의 평균 섬유장은 무처리 펄프의 섬유장인 0.6 mm보다 더 긴 0.7 mm 전후의 값을 지닌다. 이는 미세분들이 효소에 의해 저분자량의 당의 형태로 분해되어 미세분이 감소하고 그로 인하여 섬유장이 증가한 것으로 판단된다.

Endoglucanase와 endoxylanase의 혼합비 80:20, 60:40, 40:60 전처리 펄프는 pH 6보다 pH 7에서 미세분이 덜 감소하였다. 이는 pH 7보다 pH 6에서 endoxylanase의 활성이 더 높아 세 조건에서 미세분이 더 많이 녹았기 때문으로 판단된다.

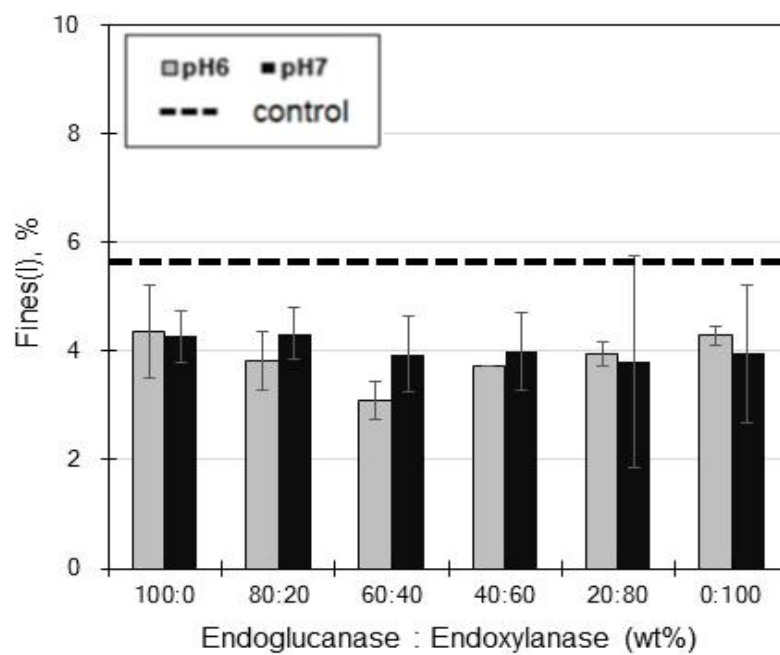


Fig. 4. Fines content of endoenzyme-treated pulp.

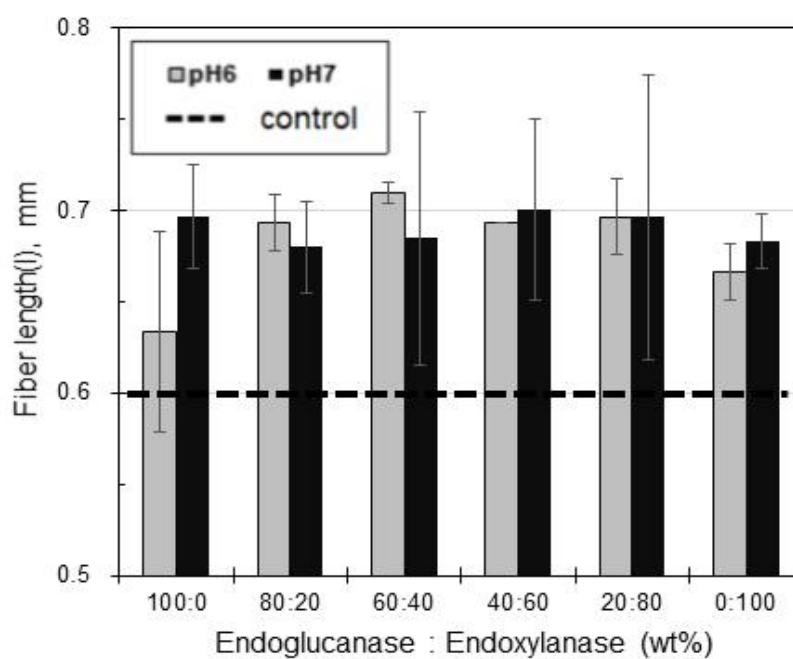


Fig. 5. Fiber length of endoenzyme-treated pulp.

4.1.2.2 여수도

단일 효소 전처리 결과는 endoglucanase 처리된 펄프는 여수도가 점선으로 표시한 무처리 펄프의 여수도보다 소폭 증가하였으나 endoxylanase 전처리 펄프는 무처리펄프보다 여수도가 소폭 감소하거나 큰 차이가 없었다.

Endoglucanase와 endoxylanase를 혼합하여 사용한 펄프의 여수도 결과를 보면 pH 6과 pH 7에서 그 결과가 차이난다. 우선 pH 7 조건 여수도 측정 결과에서 두 효소의 혼합비에 상관 없이 무처리 펄프나 단일 효소 전처리 펄프보다 혼합 효소 전처리 펄프들이 여수도 값이 30이상 증가하였으며, 이는 펄프의 구성 성분중 가장 많은 성분비를 지니고 있는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 각각을 분해 할 수 있는 두 효소를 함께 사용하였기 때문에 효소의 접근성이 크게 개선 된 결과 동일한 양의 단일 효소를 사용하였을 때 보다 피브릴화나 미세분 변화등에서 더 극적인 결과 차이가 발생하였기 때문으로 판단된다.

pH 6조건에서는 pH 7조건과 동일한 양과 혼합비의 효소를 투입하였음에도 pH 7에서의 효소 전처리 펄프의 여수도가 더 높게 증가했다. 이를 통해 볼 때, 여수도 증가에 영향을 미치는 정도는 pH 6에서 활성이 우세한 endoxylanase보다 pH 7에서 활성이 우수한 endoglucanase의 영향이 더 크다. 효소 혼합 조건 자체로 보면 endoglucanase를 더 많이 증가한 투입비일수록 pH 조건 간의 여수도 차이가 크게 나타났는데, 이는 pH 6과 7이 endoglucanase의 활성 pH 범위 이내이지만 endoglucanase의 활성이 pH 7에서 더 높기 때문에 이런 차이가 발생한 것으로 생각된다. pH 7조건에서는 endoxylanase의 활성이 낮아도 높은 여수도 증가 폭을 보이는 것은 펄프의 여수도 증가에 endoglucanase의 작용보다 endoxylanase작용이 미치는 영향이 더 크기 때문에 소량의 endoxylanase 활성만으로도 큰 여수도 변화를 보인 것으로 추정된다. endoglucanase : endoxylanase 혼합비 80 : 20 조건과 100 : 0 조건을 비교해보면 endoxylanase 투입 여부가 미치는 영향을 비교할 수 있다. 그러나 pH 6조건에

서는 endoxylanase의 활성이 증가하였어도 endoxylanase의 활성이 펄프의 물성 변화에 미치는 영향이 적고, endoglucanase의 활성이 같은 활성 범위 내에서도 감소하였기 때문에 효소 혼합 전처리 펄프의 여수도가 pH 7조건에서 더 크게 증가한 것으로 판단된다.

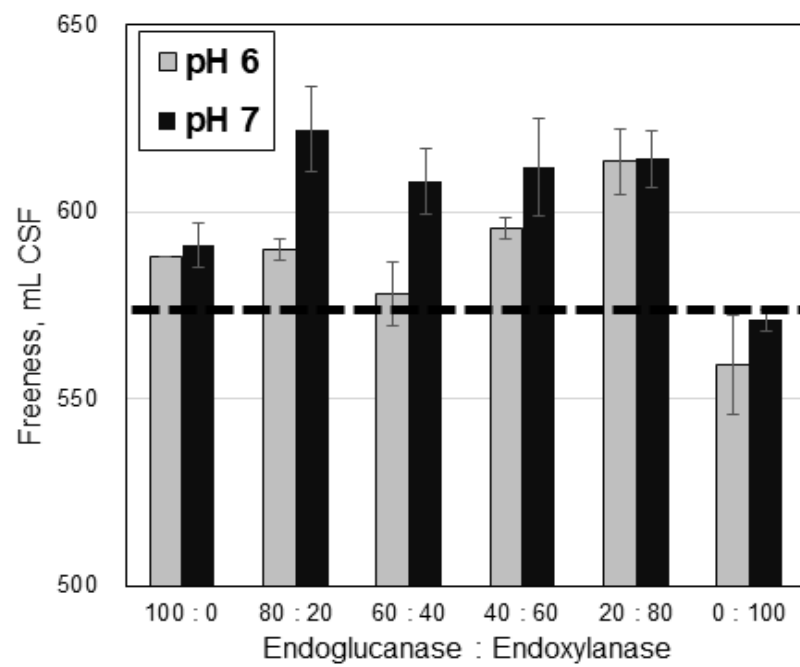


Fig. 6. Freeness of endoenzyme-treated pulp.

4.1.2.3 보수도

단일 효소 전처리로는 점선으로 표시한 무처리 펄프와 보수도 차이가 3%까지 감소하였다. 그러나 효소를 혼합하여 사용한 조건은 무처리 펄프보다 0.1 g/g 이내의 보수도 증가를 보이며 무처리펄프의 보수도보다 6%까지 높은 보수도를 보였다.. 미세분은 일반 장섬유보다 헤미셀룰로오스와 리그닌이 많으며, 비표면적이 넓고, 단위 질량 당 수분에 의한 팽윤율이 두배까지 크다.³⁸⁾ 보수도는 미세분이 많을수록, 그리고 내부 피브릴화가 증가할수록 커지는데, 효소 전처리 결과로 미세분이 감소하였음에도 불과하고 보수도가 증가한 것은 효소 혼합 전처리 결과로 펄프에 내부 피브릴화가 발생하였기 때문일 것이다. pH 6, endoglucanase : endoxylanase 60:40 조건이 높은 보수도값을 보였으나 전체적으로 pH 7 조건에서 효소 혼합 전처리를 하였을 때 pH 6에서의 보수도보다 더 높은 보수도 증가를 보였기에 pH 7 조건에서 효소를 혼합 전처리 할 때, pH 6에서 효소를 혼합전처리 할 때 보다 펄프에서 내부 피브릴화가 더 많이 발생한 것으로 판단된다.

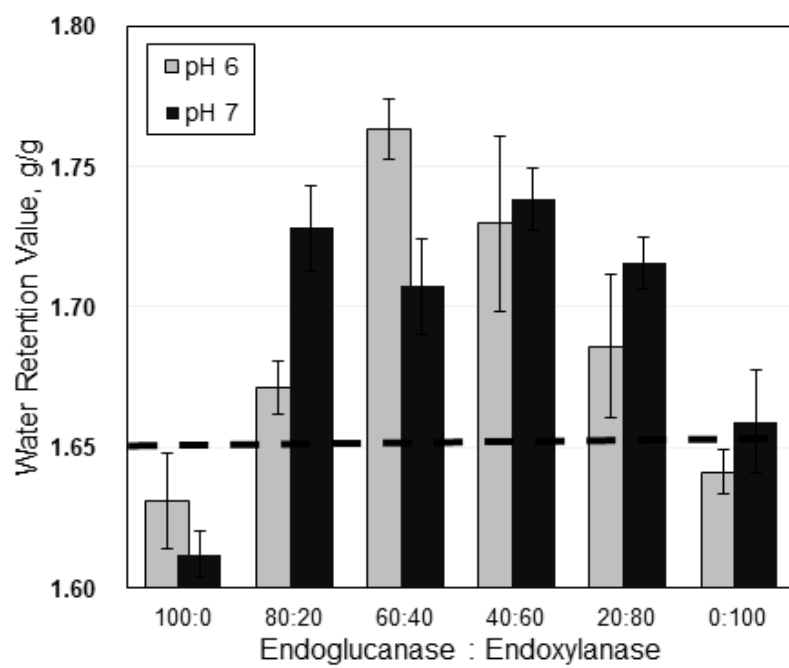


Fig. 7. Water retention value of endoenzyme-treated pulp.

4.1.2.4 CED 점도

무처리펄프, endoxylanase 전처리 펄프, endoglucanase 전처리 펄프, endoenzyme 혼합 전처리 펄프 순으로 펄프의 CED 점도가 감소하여 무처리펄프, endoxylanase 전처리 펄프, endoglucanase 전처리 펄프, endoenzyme 혼합 전처리 펄프 순서로 셀룰로오스의 중합도가 감소하였다.

pH 7조건에서는 두 효소를 혼합하였을 때, 효소의 혼합비와 상관없이 6 cPs 전후의 점도를 보였으나, pH 6 조건에서는 같은 효소 혼합, 투입조건임에도 불구하고 pH 7조건보다 더 높은 점도를 보여 셀룰로오스 중합도가 상대적으로 더 높은 것을 알 수 있다. 이는 앞에서 pH 7조건에서의 효소 혼합 전처리 조건이 pH 6조건보다 더 큰 효소 활성을 보이며 endoglucanase가 pH 6보다 pH 7에서 더 큰 효소 활성을 보인다는 점과 일치한다. 앞선 섬유장 - 미세분, 여수도, 보수도 결과와 종합하여 볼 때, endoglucanase와 endoxylanase를 단독으로 사용하여 펄프를 분해하는 것보다는, 두 효소를 혼합하여 사용할 때 효소의 활성이 더 크게 나타나며, 셀룰로오스의 중합도를 더 낮출수 있는 것을 알 수 있다.

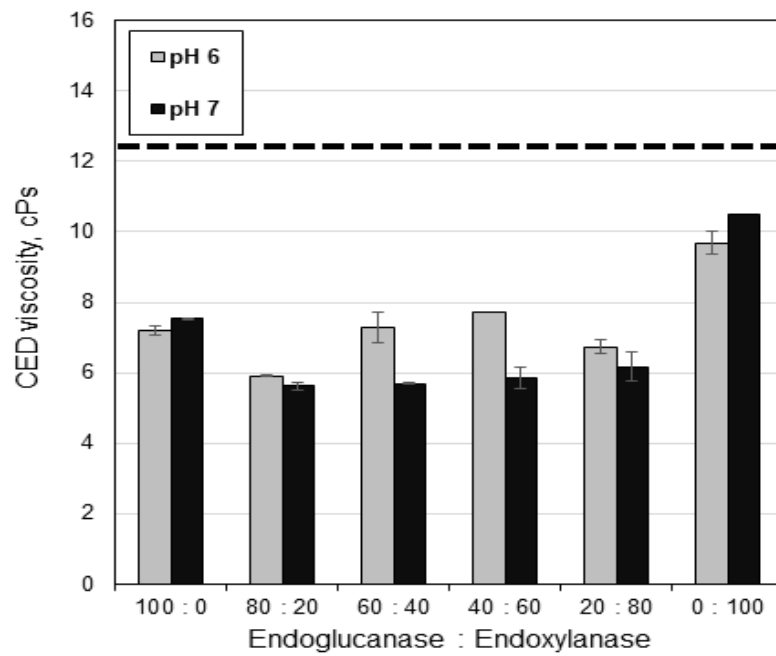


Fig. 8. CED viscosity of endoenzyme-treated pulp.

4.1.2.5 화학적 조성비

Table 3에 endoglucanase와 endoxylanase의 배합비를 달리하여 두 pH조건에서 반응시킨 각 펄프의 화학적 조성비를 제시하였다. 효소 혼합 조건에 따라 글루코오스의 함량은 81 - 84%, 자일로오스의 함량은 15.7 - 18.8%으로 약간의 차이는 있으나 뚜렷한 경향성을 보이지 않았다. 이는 효소 전처리 결과 발생하는 펄프의 손실이 크지 않기 때문에 펄프의 구성 성분비가 뚜렷하게 변화하지 않는 것으로 판단된다.

Table 3 Chemical composition of endoenzyme-treated pulp in pH6 and pH7

pH	Enzyme condition (Endoglucanase : Xylanase)	Concentration (mg / g of sample)		
		Glucose	Xylose	Mannose
-	Never-dried pulp	82.0	17.7	0.4
pH7	5 : 0	82.6	17.0	0.3
	4 : 1	81.2	18.8	-
	3 : 2	84.4	15.3	0.4
	2 : 3	81.6	18.4	-
	1 : 4	83.6	16.0	0.4
	0 : 5	84.6	15.0	0.4
pH6	5 : 0	83.5	16.2	0.3
	4 : 1	81.2	18.8	-
	3 : 2	83.9	15.7	0.4
	2 : 3	82.6	17.0	0.4
	1 : 4	83.9	15.7	0.4
	0 : 5	83.4	16.1	0.4

4.1.3 CNF 특성 평가

4.1.3.1 CNF 현탁액 저전단 점도

미건조 무처리 펄프의 경우 최종적으로 그라인더 30 - 33 통과횟수에서 1% 현탁액 기준 1200 cPs의 점도를 보였으며, endoglucanase와 endoxylanase를 각각 전처리한 펄프로는 같은 그라인더 통과횟수에서 무처리펄프로 제조한 CNF현탁액보다 더 낮은 현탁액 점도를 지닌 CNF를 얻었다. 두 효소를 혼합하여 전처리한 펄프로 제조한 CNF 현탁액은 단일 효소 전처리 펄프로 제조한 CNF 현탁액보다 더 낮은, 1% CNF 현탁액 기준 300 cPs의 점도를 가졌다. Leopold는³⁹⁾ 펄프 내에서 자일란은 셀룰로오스 결정영역의 표면에서 함께 결정화 된 상태로 존재한다고 주장하였는데, 고해가 발생하면 주로 헤미셀룰로오스에서 파괴가 발생하듯 기계적 전단력을 이용한 나노화 과정에서도 헤미셀룰로오스 영역 내에서 많은 파괴가 발생하였을 것이며, 효소 혼합 전처리 과정에서의 endoxylanase의 활성으로 셀룰로오스 결정영역 표면의 xylan이 분해되면서 나노화 과정 중 CNF의 장섬유의 잔 피브릴들이 제거되었기 때문에 CNF가 좀 더 단순한 섬유형태를 지니며 이로인해 더 낮은 점도를 지닌 것이 아닌가 추정된다.

앞서 효소 전처리 펄프의 특성 평가에 의하면 동일 효소 투입 조건에서, pH 7에서의 효소 활성이 pH 6조건보다 효과가 좋았다. 효소 전처리 펄프로 제조한 CNF 현탁액 점도 비교에서도 pH 7에서 효소 전처리를 한 경우, pH 6 조건보다 현탁액 점도가 더 낮았다.

Ryu에⁴⁰⁾ 의하면 펄프가 나노화 중 점도 변화가 감소하여 추가적 나노화 처리를 가하여도 CNF 현탁액의 점도 변화가 더 이상 발생하지 않는 구간이 나타나는 것은 펄프의 나노셀룰로오스로의 물리적 분화가 충분히 진행되었기 때문이다. Fig.9을 보면 무처리 펄프는 실험 조건 하에서 그라인더를 30 회 ~ 33 회 통과하였을 때 나노셀룰로오스로 분화가 완료된다. 그러나 endoglucanase와 endoxylanase를 혼합 전처리한 펄프로 제

조한 CNF(g:x 80:20 ~ g:x 20:80)는 무처리 펄프, endoglucanase 전처리 펄프(g:x 100:0), endoxylanase 전처리 펄프(g:x 0:100)로 제조한 CNF보다 훨씬 이른 조건인 18 회 전후에서 나노셀룰로오스로의 분화가 완성된 것을 알 수 있다. 이는 효소의 분해로 인하여 펄프 구조가 약해진 상태에서 그라인더로 전단력을 가하였기 때문에, 효소 전처리 펄프가 더 적은 나노화 에너지로도 CNF로 분화되었기 때문이다.

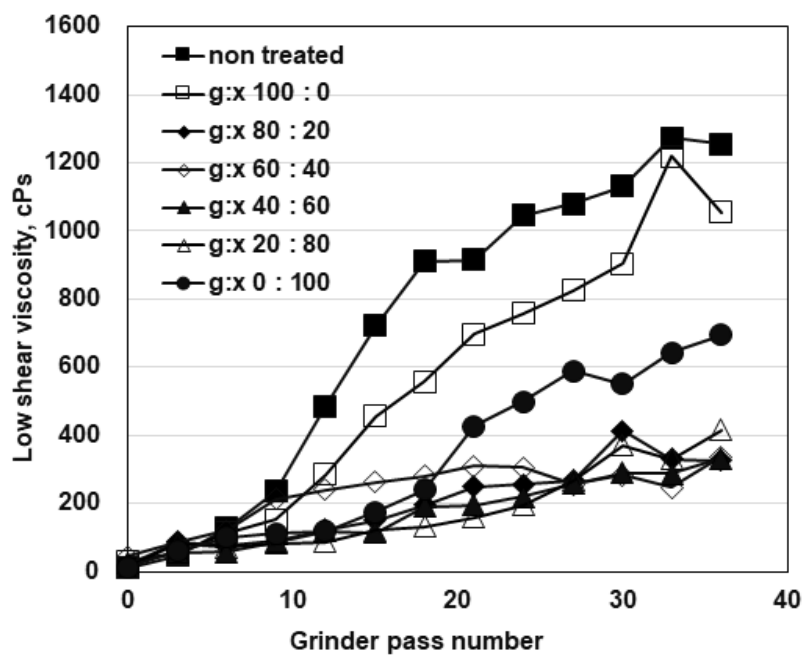


Fig. 9. Viscosity of CNF suspension prepared by grinder (pH 7) .

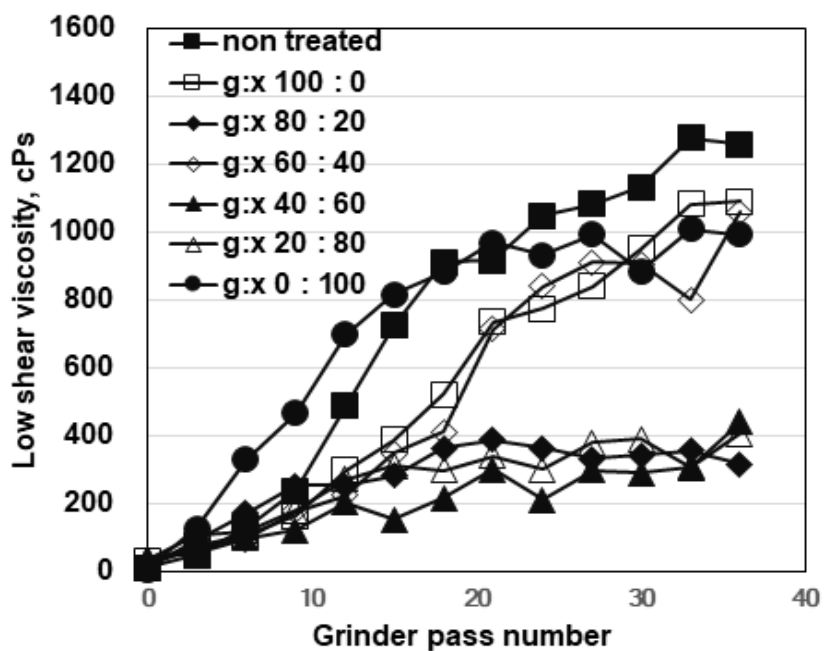


Fig. 10. Viscosity of CNF suspension prepared by grinder(pH 6).

4.1.3.2 CNF 형태

효소 활성이 우수하다고 판단되는 pH 7 전처리 조건 중, 효소 혼합 전처리 시 나노셀룰로오스로의 분화가 충분히 진행되었다고 판단되는 그라인더 18 회, 그리고 모든 전처리 조건에서 나노화가 진행되었다고 판단되는 30 회 조건에서 시료를 채취하여 SEM 이미지를 준비하였다. Fig. 11에서 볼 수 있듯이 그라인더 18 회 조건에서는 무처리펄프, endoglucanase 전처리 펄프, endoxylanase 전처리 펄프로 제조한 CNF는 아직 분화가 덜 되어서 굵직한 섬유들이 남아있다. 그러나 효소 혼합 전처리 펄프로 제조한 CNF는 다른 전처리 조건의 CNF보다 나노셀룰로오스의 폭이 더 얇게 나노화가 잘 이루어졌다.

Fig. 12에서 보는 것처럼, 각 전처리 펄프 별 그라인더 30 회 처리한 CNF는 미분화된 펄프를 찾기 힘들며 나노셀룰로오스로의 분화가 이행되었다. 이미지 분석을 통해 각 전처리 조건별 펄프로 제조한, 그라인더를 30 회 처리한 CNF의 평균 폭을 측정하였다. Fig.13에 제시한대로, 전처리 조건에 상관없이 평균 15~20 nm 사이의 폭을 지녔다.

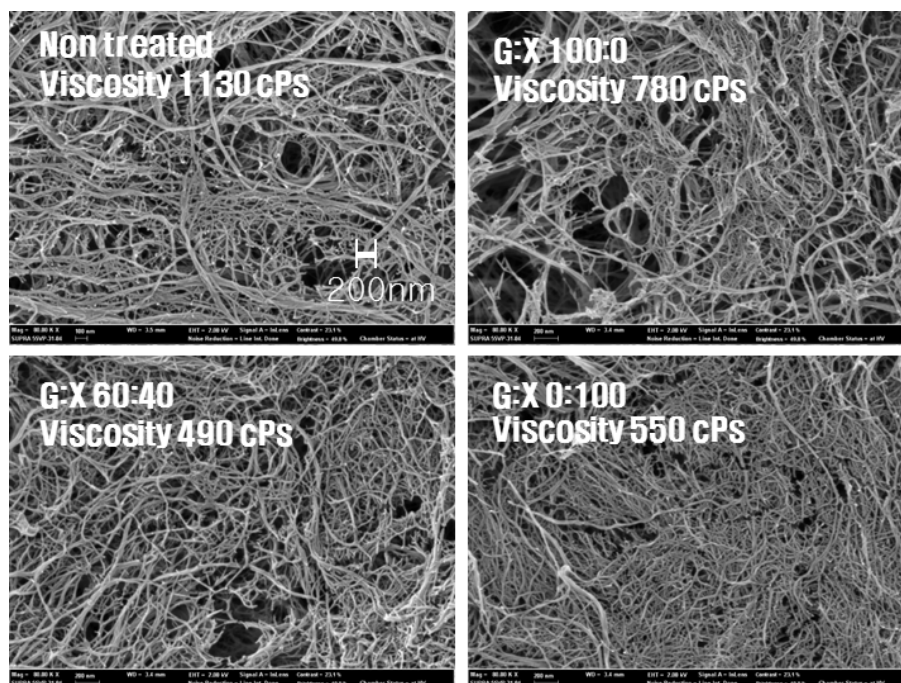


Fig. 12. SEM image of grinder 30 passes number CNF.

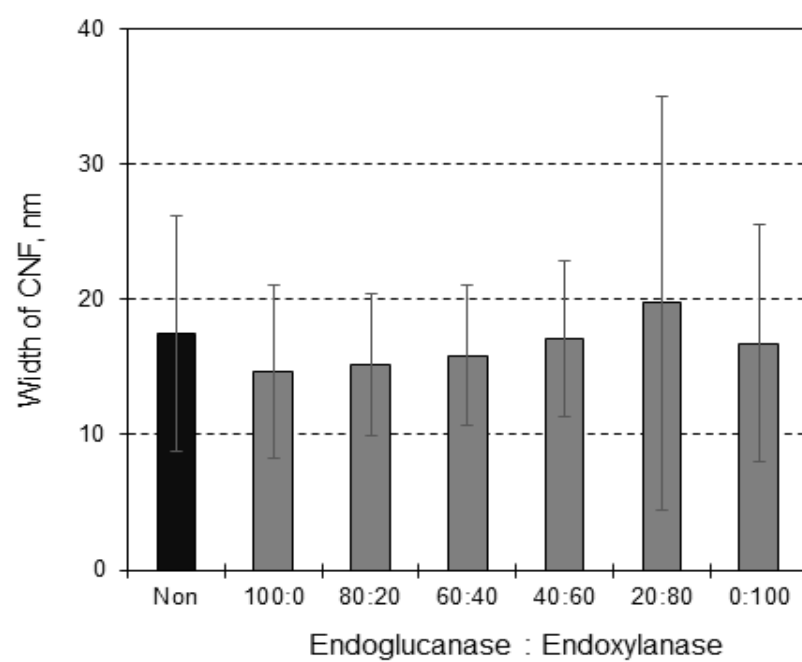


Fig. 13. Width of CNF prepared by grinder.

4.1.3.3 종횡비

Gel point concentration을 이용하여 추정한 각 전처리조건별 CNF의 종횡비는 무처리펄프는 150, 효소 전처리펄프는 효소 투입조건에 따라서 endoglucanase가 가장 많이 투입되었을 때에는 종횡비 120에서 endoxylanase가 가장 많이 투입되었을 때에는 최대 170의 종횡비를 지닌다. 이는 endoglucanase가 펄프를 분해한 후 펄프가 나노화 될 때, 효소의 분해가 최종적으로 얻게되는 CNF의 폭을 감소시키기 보다 길이를 더 감소시키는 효과가 더 크기 때문으로 판단된다.

앞서 측정한 직경값과 추정 종횡비를 이용하여 CNF의 길이를 추정하면 그라인더를 30번 통과하여 제조한 CNF는 무처리 조건에서는 9, 효소 전처리 조건에 따라 8~10 μm 의 평균 길이를 지녔다.

CNF의 종횡비도 CNF 현탁액의 점도에 영향을 미치는데²⁰⁾, Fig. 15에 나타낸 전처리 조건 별 CNF의 종횡비 변화양상과 Fig. 9에서의 현탁액의 점도 변화 양상이 일치하지 않기 때문에 현탁액의 점도 변화 감소를 종횡비 감소만으로 설명할 수는 없다. 다른 추가적인 변수가 있는것으로 판단된다.

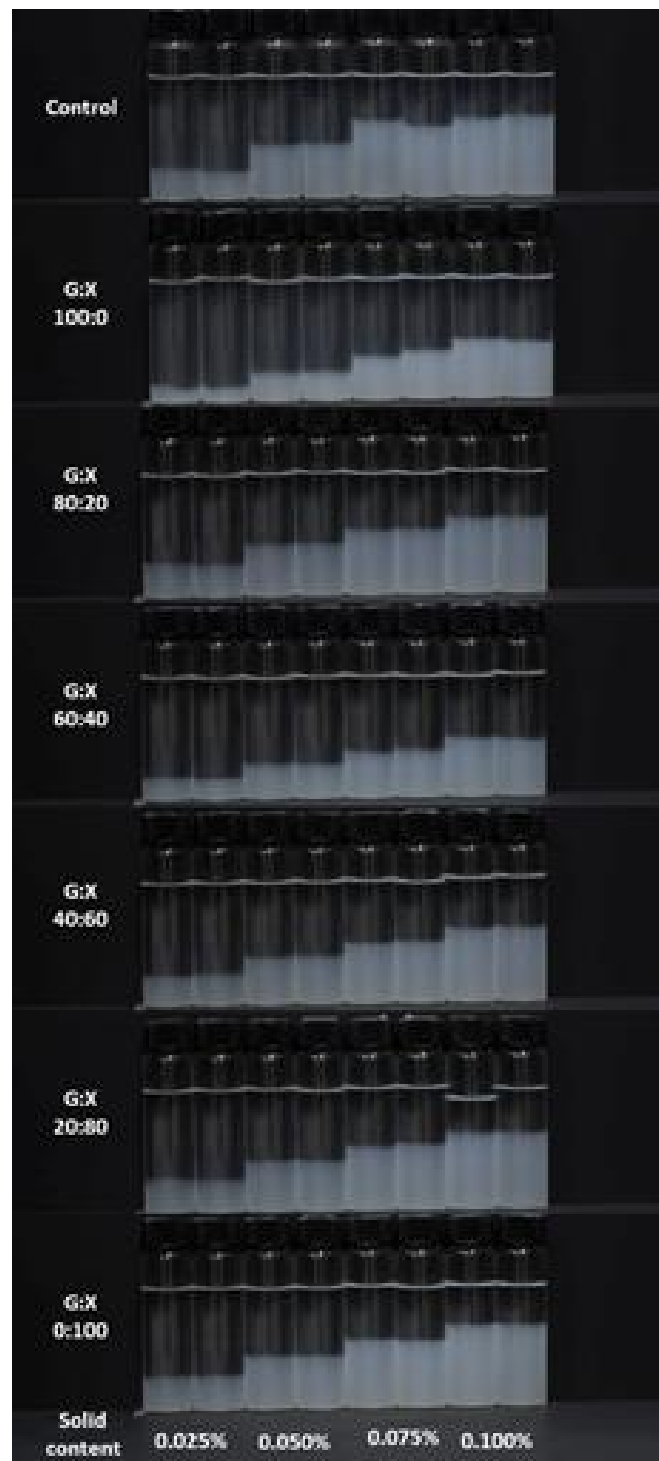


Fig. 14. Sedimentation of CNF suspension prepared by grinder.

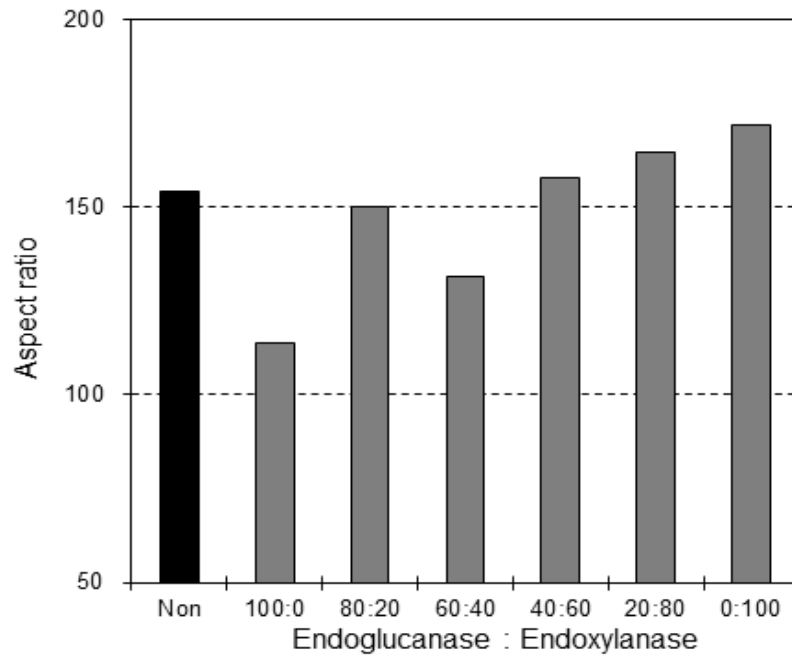


Fig. 15. Aspect ratio of CNF calculated from gel point concentration.

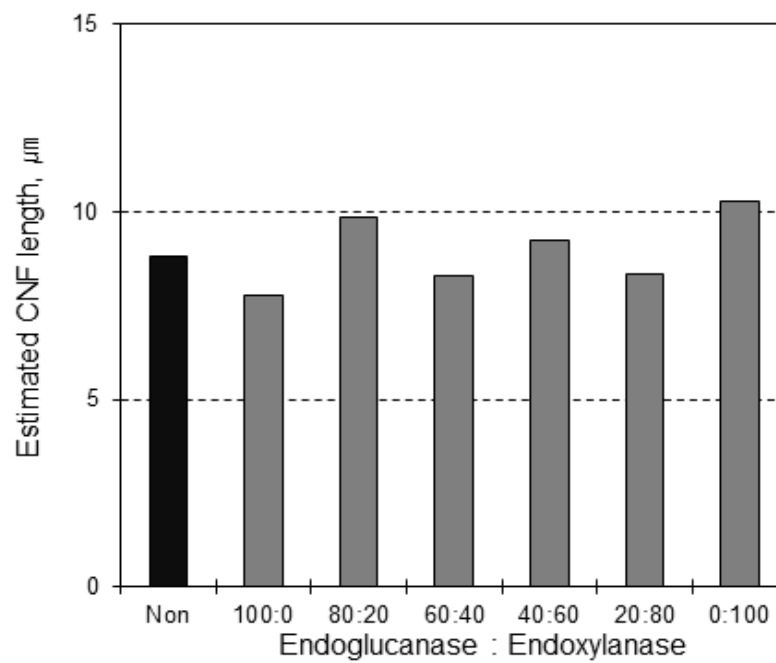


Fig. 16. Estimated CNF length prepared by grinder.

4.2 Endoenzyme 혼합 전처리 후 고해 펄프

4.2.1 펄프 특성 평가

4.2.1.1 섬유장

무처리펄프는 고해 시 미세분이 소폭 증가하나, 효소 전처리 펄프는 무처리 펄프보다 미세분이 크게 발생하여, 무처리펄프는 3%가량 미세분이 증가하는 동안 효소 전처리 펄프는 그 3배에 이르는 9%까지 미세분이 더 쉽게 발생한다.

고해 시 미세분 결과에서는 endoxylanase를 더 많이 투입하여 전처리한 펄프일수록 고해로 미세분의 발생량이 증가하는 경향을 보인다. 효소 전처리가 미세분을 감소시키는 효과는 단일 효소 전처리보다 두 endoenzyme을 혼합하여 전처리 한 조건이 더 크지만, 고해를 거치면서 미세분이 증가하는 경향은 endoxylanase가 더 많이 투입될수록 크게 나타난다. 펄프에 고해를 가하면 헤미셀룰로오스에서 파괴가 주로 발생하는데, endoxylanase 투입량 증가로 헤미셀룰로오스 내부의 구조가 파괴되었고, 이 상태에서 고해로 물리적 충격이 가해지면서 무처리펄프 보다 endoxylanase 전처리 펄프에서 헤미셀룰로오스가 더 쉽게 분해되어 미세분이 크게 발생하는 것으로 추정된다.

평균 섬유장은 고해 전에는 효소 전처리 펄프는 효소 혼합조건이 미세분이 더 제거되었기 때문에 가장 높지만, 고해를 거치면서 endoxylanase를 많이 투입할수록 미세분이 증가하기 때문에 평균섬유장도 감소했다.

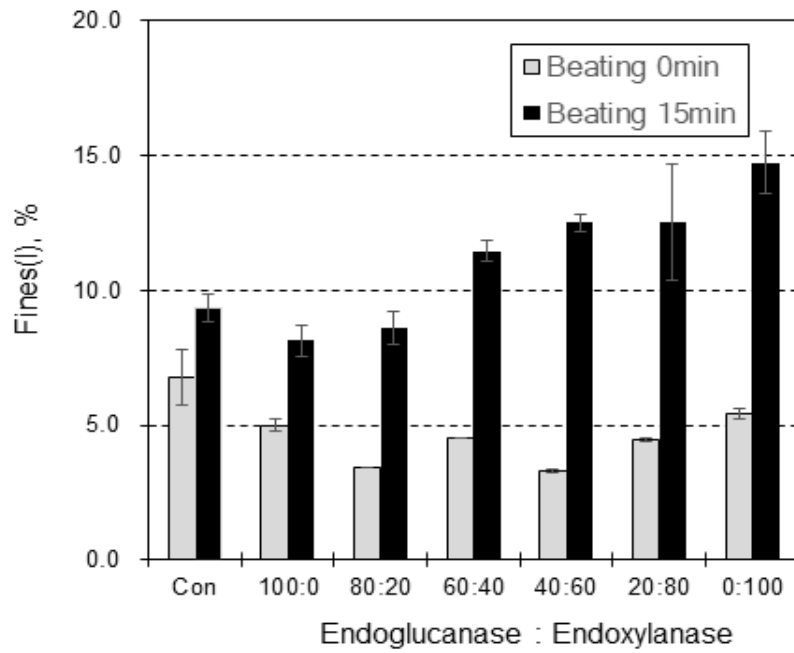


Fig. 17. Fines content of endoenzyme-treated pulp by beating.

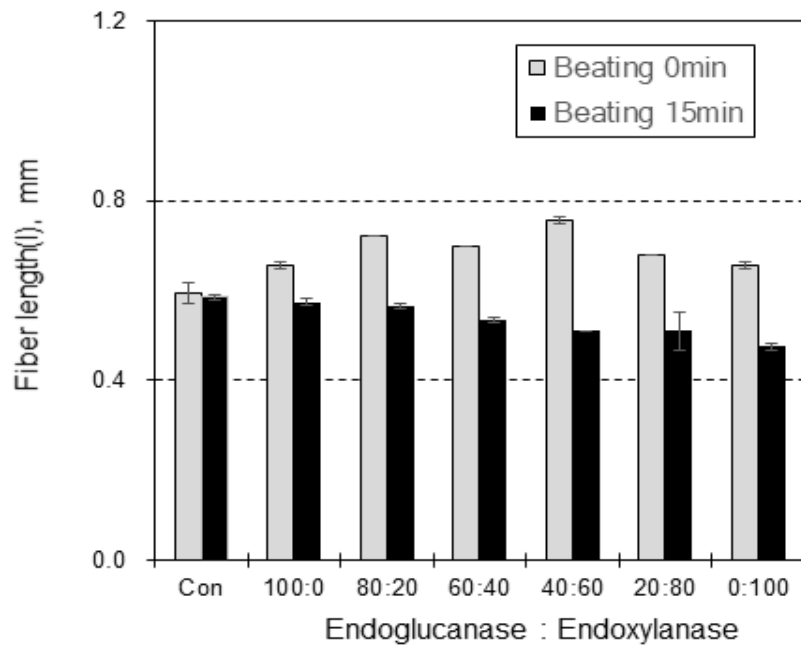


Fig. 18. Fiber length of endoenzyme-treated pulp by beating.

4.2.1.2 여수도

무처리 펄프와 단일 효소 전처리 펄프는 고해 시간에 따라 선형적인 여수도 감소를 보인다. 그러나 효소 혼합전처리 펄프는 초기에 급격하게 여수도가 감소하여 무처리, 단일전처리 펄프보다 여수도가 더 감소하다가, 15분 고해 시에는 오히려 무처리, 단일 전처리 펄프보다 높은 여수도를 보였다.

펄프에 고해가 가해지면 단섬유화, 미세분 발생, 내부 피브릴화와 외부 피브릴화의 기작이 복합적으로 일어나는데, 각각의 기작이 펄프의 여수도에 미치는 영향은 다르다. 효소 혼합 전처리 펄프는 무처리나 단일 효소 전처리 펄프보다 같은 강도의 고해에도 더 쉽게 피브릴화나 미세분 발생등이 일어난 결과가 fig. 19와 같은 결과를 발생시킨 것으로 예상된다.

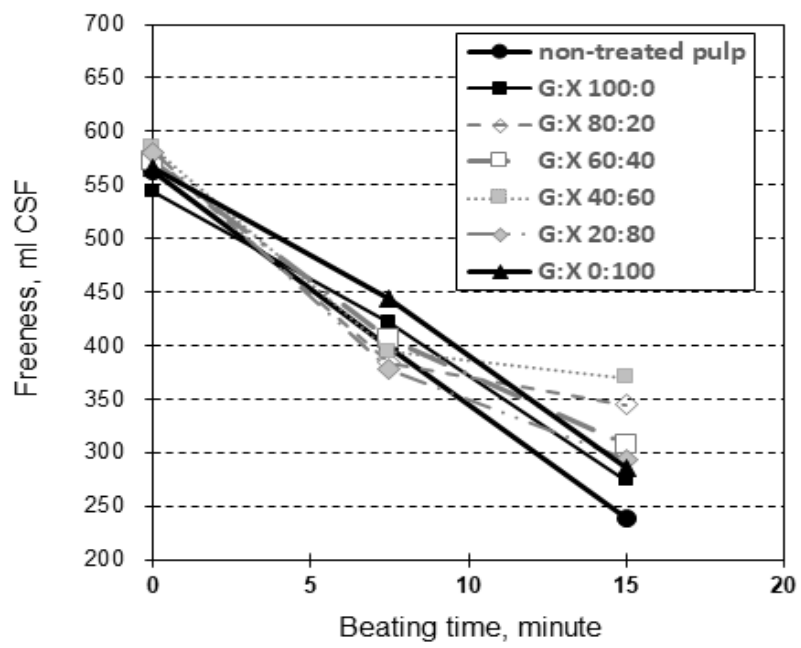


Fig. 19. Freeness of enzyme-pretreated pulp by beating.

4.2.1.3 보수도

효소 전처리 펄프는 무처리, 단일효소 전처리 펄프와 효소 혼합전처리 펄프 간의 보수도는 고해를 거치며 더 차이가 커진다. 고해 전에는 효소 혼합 전처리된 펄프의 보수도는 무처리-단일효소 전처리된 펄프보다 0.03~0.07 g/g 더 높았으나, 고해 후에는 그 차이가 0.18~0.24 g/g까지 증가하였다. 효소가 혼합하여 사용된 경우 endoglucanase와 endoxyalanse의 시너지로 인해 단일 효소 전처리 조건보다 펄프 구성 성분을 더 많이 분해하여 구조가 약해진 펄프는 그렇지 못한 펄프보다 동일한 고해 조건에서 더 손쉽게 피브릴화가 발생하기 때문으로 판단된다.

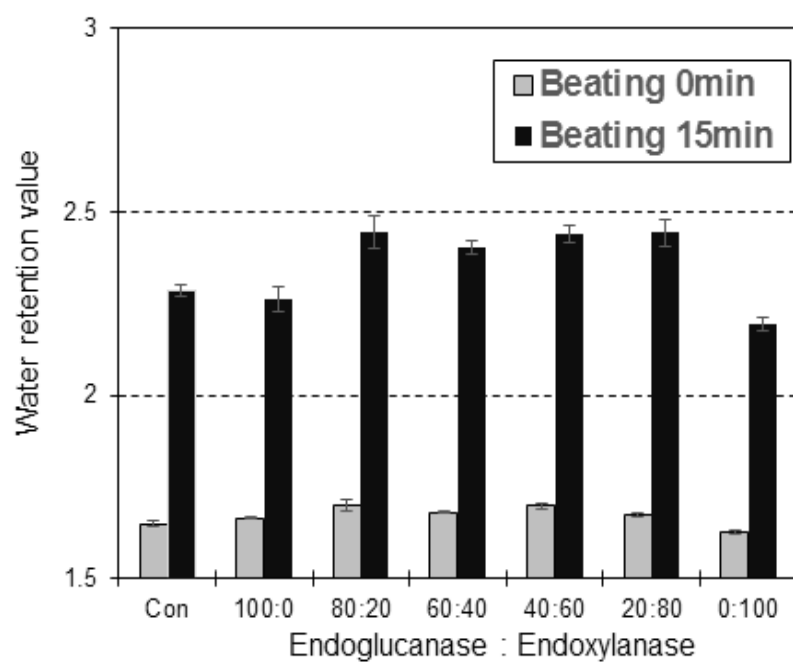


Fig. 20. Water retention value of enzyme-pretreated pulp by beating.

4.2.1.4 결정화도

각 효소 전처리 펄프의 고해 실시 여부에 따라 측정한 펄프의 XRD 결과를 Fig. 21과 Fig. 22에 제시하였다. 이 결과를 토대로 segal법을 따라 결정화도를 계산하면 효소 전처리 조건이 결정화도에 미치는 영향과 고해가 가 전처리 펄프의 결정화도 변화에 미치는 영향은 크지 않았다.

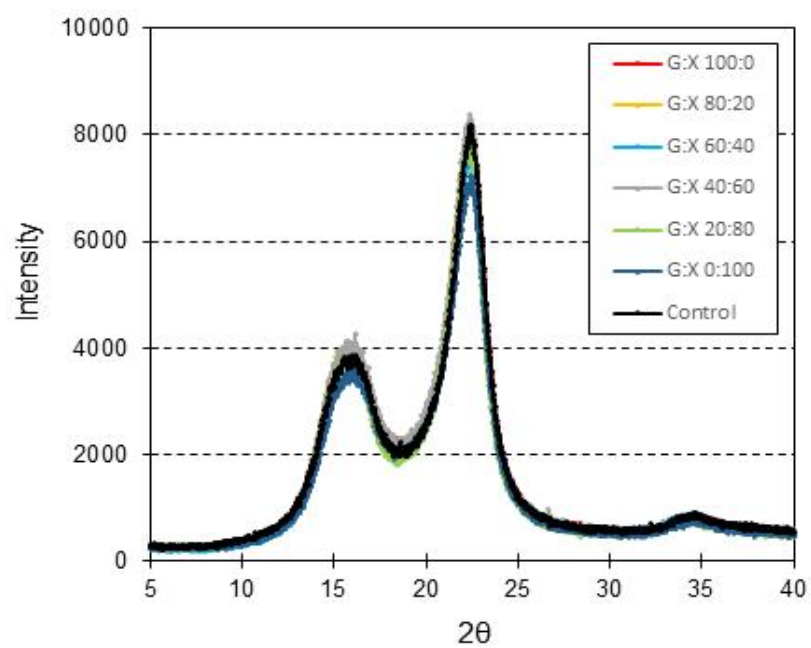


Fig. 21. XRD spectrum of enzyme-pretreated pulp

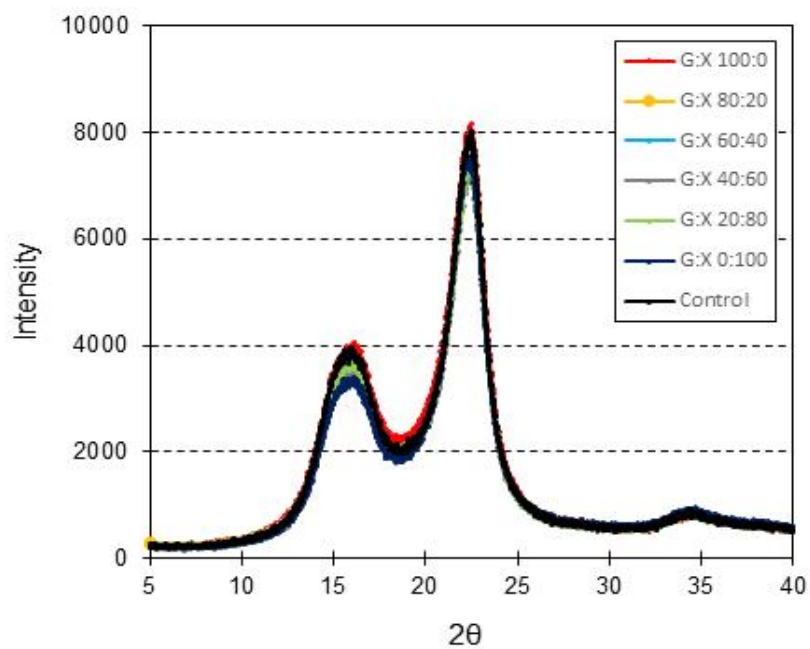


Fig. 22. XRD spectrum of enzyme-pretreated pulp after beating.

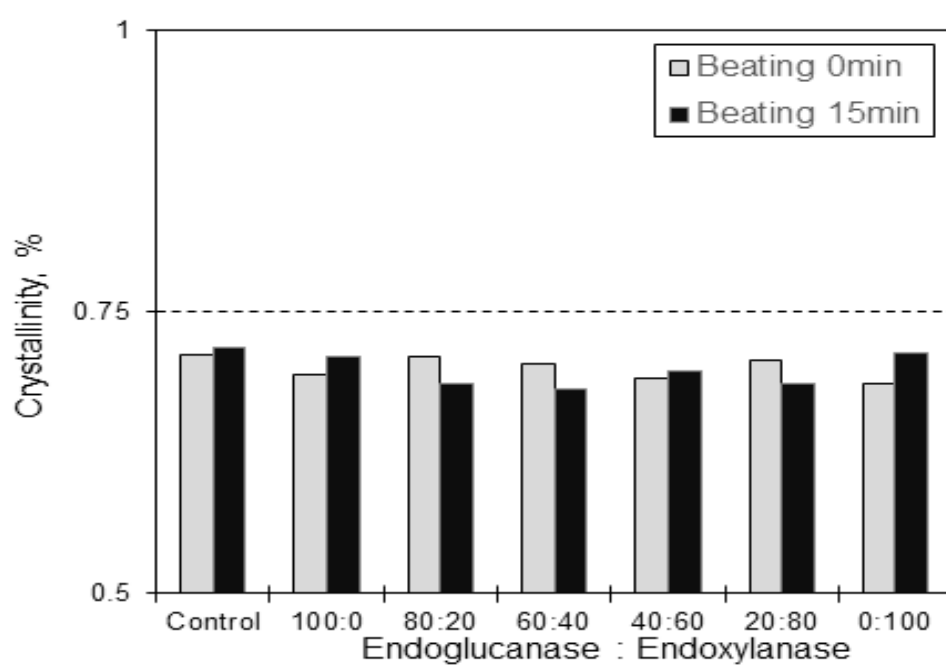


Fig. 23. Crystallinity of enzyme-pretreated pulp by beating.

4.2.2 CNF 특성 평가

4.2.2.1 전처리 펄프 별 그라인더 및 호모게나이저 구동

효소 전처리 펄프와 효소 후 고해 전처리 펄프는 지료 농도 1.5% 조건에서 그라인더를 이용하여 막힘 없이 나노화 진행이 가능하였다. 지료 농도 1% 조건에서 무처리 펄프와 모든 효소 투입 조건의 전처리 펄프는 호모게나이저 구동 중 막힘이 발생하여 나노화가 불가하였다. 이를 개선하기 위해 endoglucanase:endoxylanase 40:60 전처리 펄프를 5, 10, 15 분간 고해하여 시료를 준비하고 호모게나이저로 나노화 하였을 때, 10, 15분 고해 펄프는 나노화가 가능하였다. 효소 전처리 없이 고해만 15분 진행한 펄프와 Endoxylanase 0.5 wt% 전처리 후 고해를 15분 진행한 펄프는 지료를 투입하여도 막힘이 발생하여 1% 농도의 펄프 현탁액으로는 나노화가 안되었다.

4.2.2.2 CNF 현탁액 저전단 점도

효소 후 고해 전처리 펄프는 그라인더와 호모게나이저를 이용하여 나노화를 진행하였다. 호모게나이저를 이용한 펄프의 나노화 시 고해를 거치지 않은 펄프는 막힘이 발생하기 때문에 15분간 고해 후 호모게나이저를 이용하여 나노화 하였다. 준비된 펄프는 Fig. 1에서 제시한 조건대로 압력을 조절하여 나노화 하였다.

효소 전처리 후 고해펄프로 그라인더를 이용하여 제조한 CNF는 15~18회 그라인더를 통과하였을 때 나노화가 완료되었다. 효소전처리 펄프를 나노화하면 최종적으로 300~400 cPs의 점도를 지닌 CNF를 얻었으나, 효소 전처리펄프를 고해를 추가적으로 가한 후 그라인더로 나노화하면 800~1200 cPs의 점도를 지닌 CNF를 얻었다. 효소를 혼합하여 전처리 한 펄프를 나노화하여 얻은 CNF는 무처리나 단일 효소 처리 CNF보다 낮은 점도를 가졌지만, 효소전처리 후 고해를 한 경우, 더 높은 점도

를 지닌 CNF 현탁액으로 제조되었다. 이 차이는 펄프가 고해를 거치며 발생한 피브릴화가 CNF 현탁액의 형태에 미치는 영향에서 기인한 것으로 보인다.

효소 전처리 후 고해펄프로 호모게나이저를 이용하여 제조한 CNF는 25회 통과 시 400 ~ 600 cPs사이의 점도를 보였으며, 이는 효소 전처리 펄프로 그라인더를 이용해 제조한 CNF의 300~400 cPs보다 200 cPs 더 높다. 고해를 거치지 않고 그라인더를 이용하여 제조한 CNF는 효소 혼합 조건간에는 점도 차이를 찾기는 어려웠지만 endoglucanase 0.5% 단일 전처리 펄프로 제조한 CNF와는 점도 차이를 보였다. 그러나 고해 후 호모게나이저를 이용하여 제조한 CNF에서는 효소 혼합 전처리 펄프조건 중 endoglucanase:endoxylanase 60:40 투입조건이 다른 효소 투입조건보다 더 낮은 점도를 지녔으나 그 외에는 혼합조건과 효소 단일 전처리 조건간에 큰 점도차이를 찾기 어려웠다.

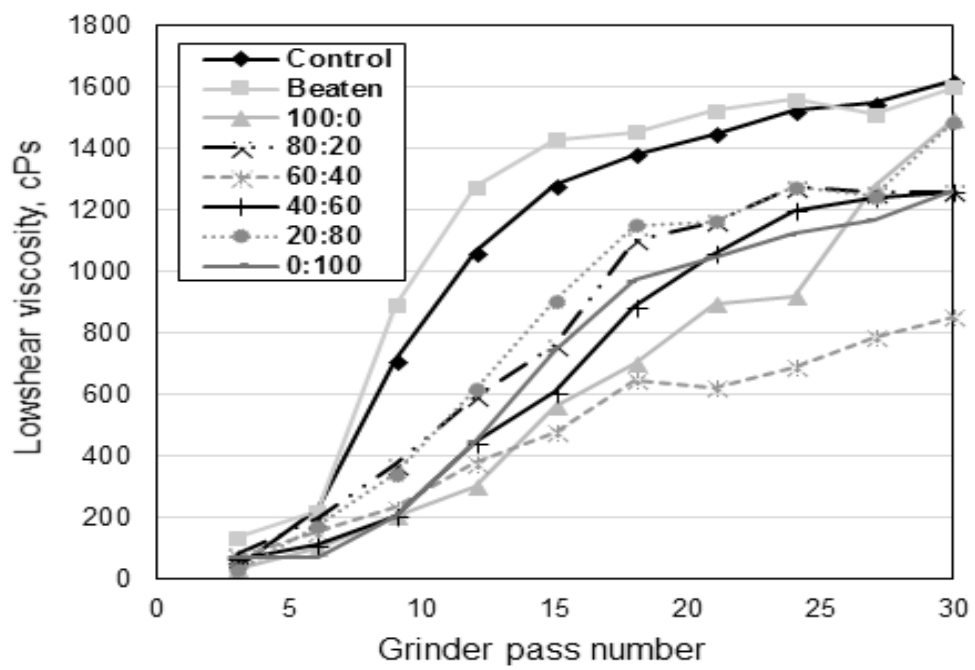


Fig. 24. Viscosity of CNF suspension prepared by grinder (enzyme + beating).

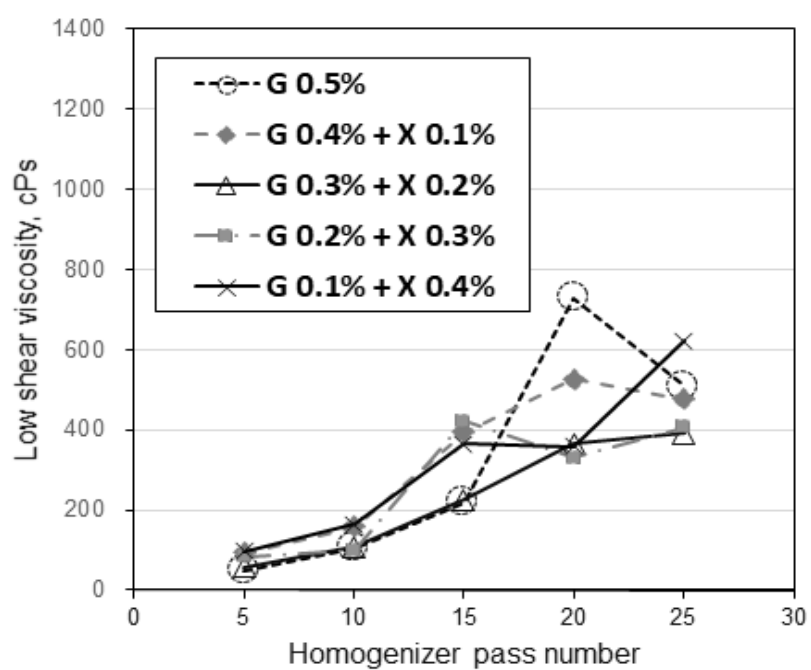


Fig. 25. Viscosity of CNF suspension prepared by homogenizer (enzyme + beating).

4.2.2.3 CNF 형태

Fig. 25는 효소전처리 후 고해 펄프를 그라인더를 30회 통과시켜 제조한 CNF의 SEM이미지이다. Fig. 26는 나노화가 완료되었다고 판단되는, 각 효소전처리 후 고해 펄프의 호모게나이저 25회 나노화 CNF이미지이다. 호모게나이저를 이용하여 제조한 CNF는 두꺼운 CNF는 보이지 않으며 전체적으로 얇고 고르게 나노화가 되었다. Fig. 12와 Fig. 26을 비교하면, 똑같은 효소 전처리 조건으로 같은 조건에서 그라인더를 제조하여 30회 통과하였는데, 중간에 고해가 추가된 Fig. 26의 효소전처리 후 고해 펄프를 이용한 CNF가 더 두꺼운 폭을 지녔다. 이는 고해로 발생한 피브릴화가 펄프의 나노화에 영향을 미쳤기 때문으로 판단된다. 효소전처리 후 고해 펄프를 그라인더를 이용하여 제조한 CNF는 평균적으로 30 nm를 조금 넘는 폭을 지녔으나 호모게나이저를 이용하여 제조한 경우 더 얇은, 평균 폭이 약 20 nm인 CNF가 되었다. 같은 그라인더를 이용하여 제조하였어도, Fig. 12에 있는 고해를 거치지 않은 CNF보다 더 두터운 CNF를 얻은 것을 알 수 있다.

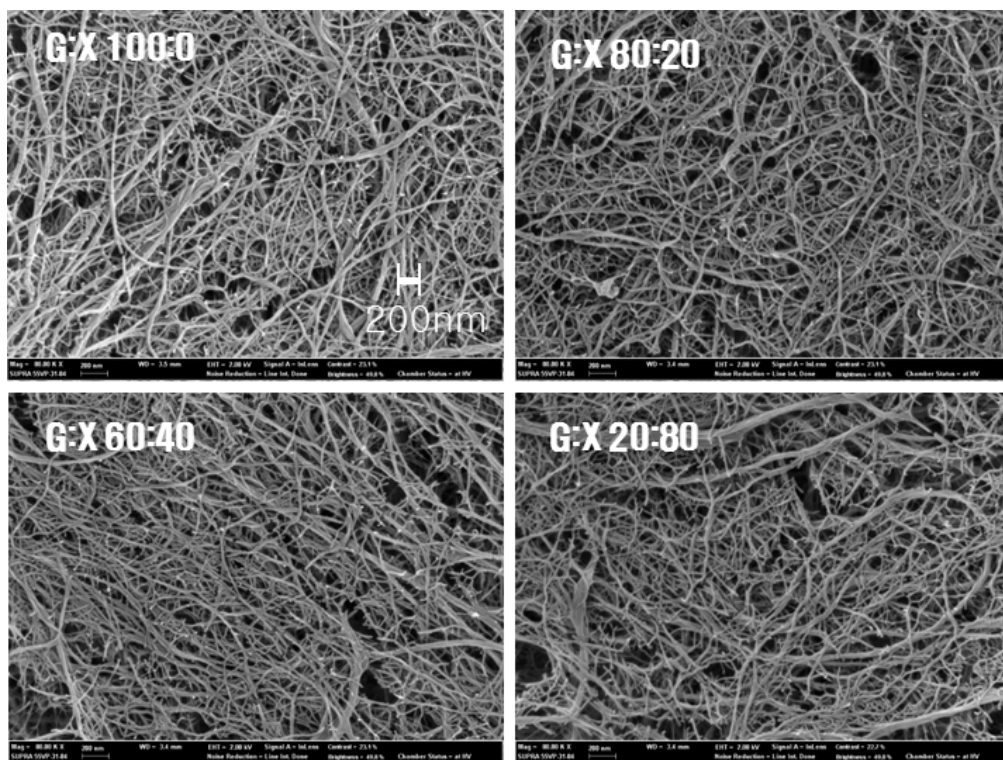


Fig. 27. SEM image of homogenizer at 25passes number CNF (enzyme + beaten).

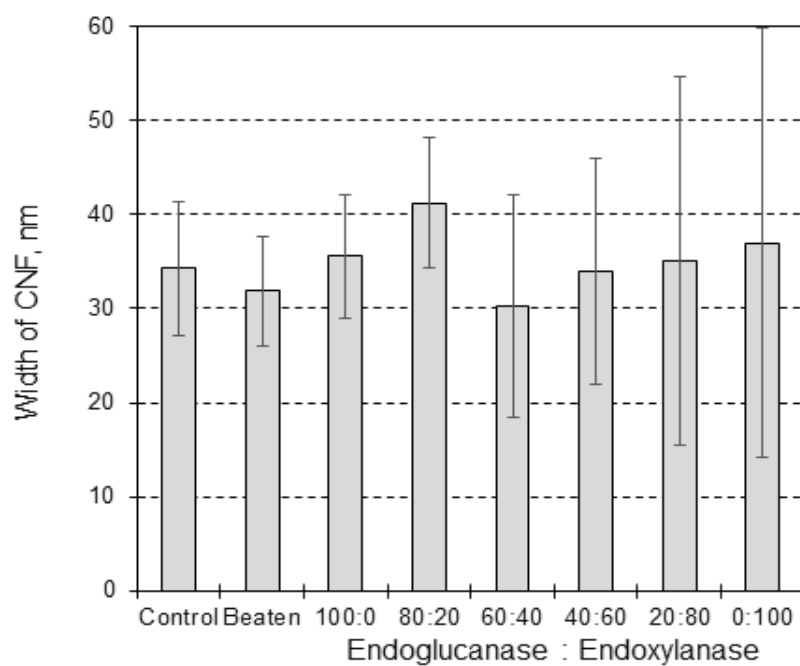


Fig. 28. Width of CNF prepared by grinder (enzyme+beaten).

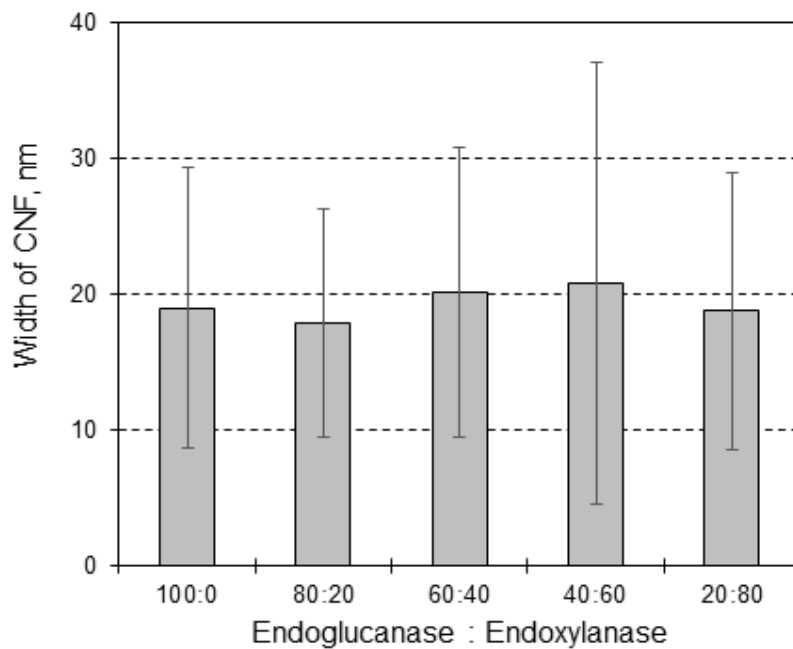


Fig. 29. Width of CNF prepared by homogenize (enzyme+beatenr).

4.2.2.4 종횡비

Gel point concentration을 이용하여 추정된 CNF의 종횡비를 Fig. 30, 32에 제시하였다. 그라인더를 이용하여 제조한 CNF는 70~100 사이의 종횡비를 지니지만, 호모게나이저를 이용하여 제조한 CNF는 120~130 정도의 종횡비를 지녔다. 종횡비와 폭을 이용하여 길이를 추정한 결과 종횡비 추세가 다름에도 불구하고 그라인더와 호모게나이저를 이용하여 제조한 CNF는 2~3 μm 의 평균 길이를 지녔다. 이는 Fig. 16에서 앞서 제시한, 고해를 하지 않고 그라인더를 이용하여 제조한 CNF의 평균 길이인 7~10 μm 보다 더 짧은 값이다. 이를 통해 볼 때, CNF를 제조하기 전에 펄프에 고해를 가하면 평균 길이는 더 짧고 폭은 더 두꺼우며 CNF 현탁액의 점도가 더 높은 CNF를 제조할 수 있는것으로 생각된다.

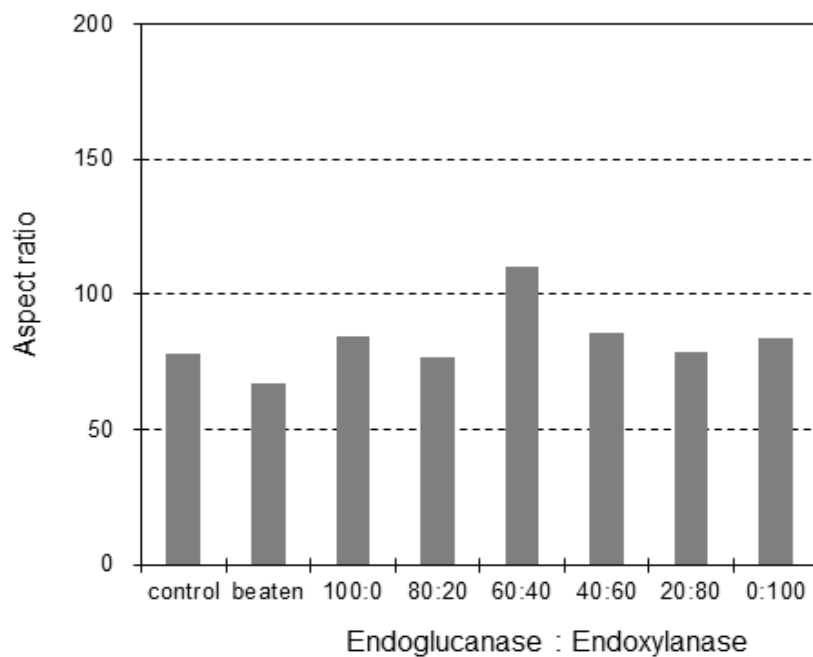


Fig. 30. Aspect ratio of CNF prepared by grinder (enzyme + beaten).

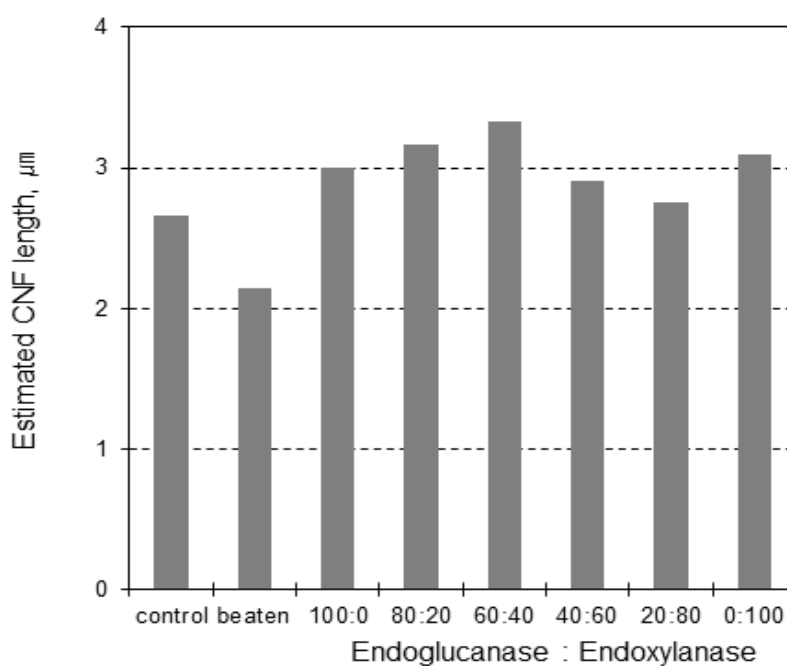


Fig. 31. Estimated CNF length prepared with grinder (enzyme + beaten).

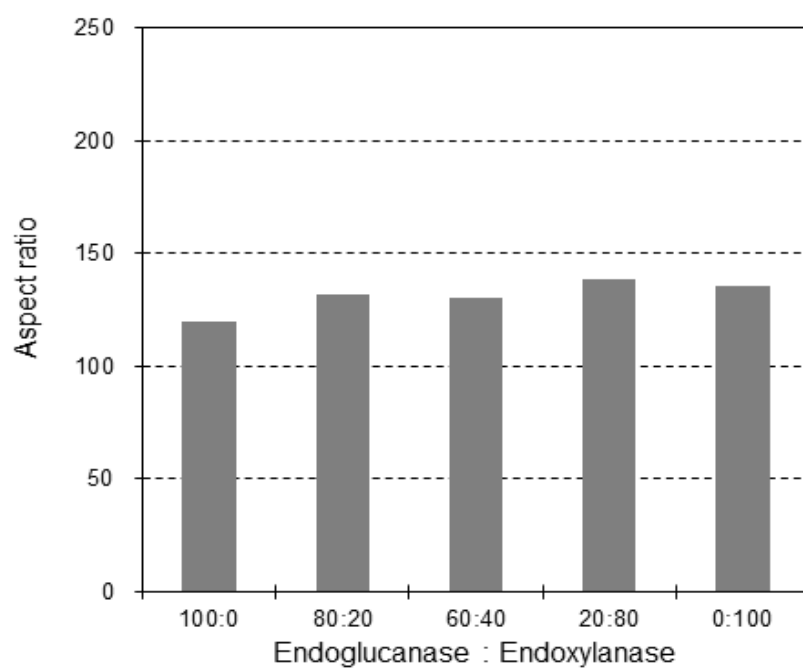


Fig. 32. Aspect ratio of CNF prepared with homogenizer (enzyme + beaten).

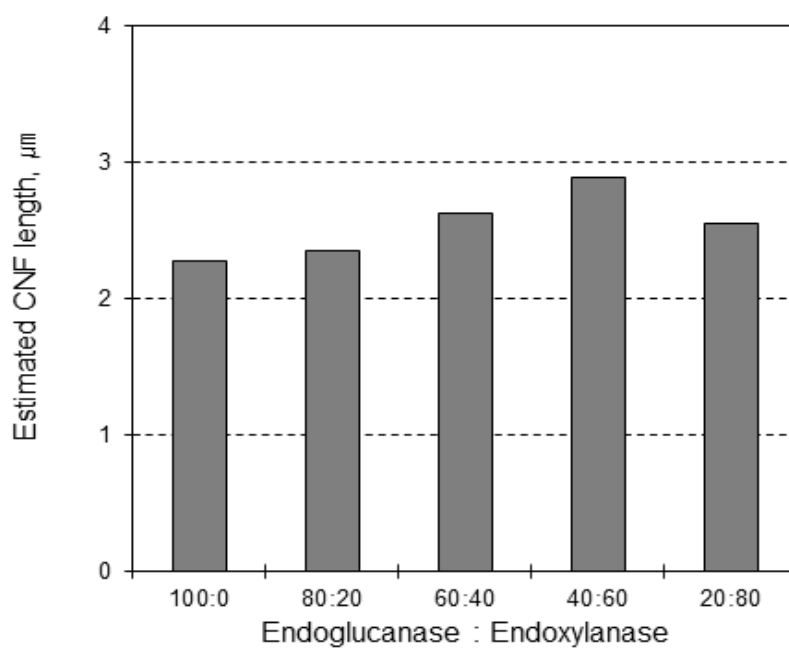


Fig. 33. Estimated CNF length prepared with homogenizer (enzyme + beaten).

5.결론

본 연구에서는 endoglucanase와 endoxylanase를 이용하여 펄프를 처리하고 그에 따른 펄프의 특성과 CNF 물성 변화를 측정하였다. 효소의 총 투입량이 일정한 상황에서 endoglucanase와 endoxylanase를 혼합비를 다르게 하여 펄프에 대하여 효소 전처리를 진행하였다. 각 전처리 펄프의 섬유장, 여수도, 보수도, CED 점도, 화학적 조성비 변화를 평가하고 각 효소 전처리 펄프를 그라인더를 이용하여 CNF를 제조하였다. 최종적으로 획득한 CNF의 형상과 폭, 중횡비, 현탁액 점도 변화를 측정하여 endoenzyme 처리가 펄프와 CNF에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

Endoenzyme + 고해 전처리 펄프를 준비하였다. 효소 전처리 펄프가 고해에 따라 어떠한 물성 변화를 보이는지 관찰하였고, 그라인더와 호모게나이저를 이용하여 CNF를 제조, 그 특성을 평가하였다.

효소 전처리는 펄프의 미세분을 감소시키며, 평균 섬유장이 증가한다. 여수도와 보수도가 증가하고 셀룰로오스의 중합도가 감소한다. 이러한 결과들은 효소를 한가지만 사용한 조건보다는 효소를 혼합하여 사용하였을 때 더 큰 효과를 보였다.

실험에 사용한 효소들의 활성 pH를 고려하여 pH 6과 pH 7 두 조건에서 여수도, 보수도, CED 점도 측정을 하였을 때, pH 7에서 pH 6조건보다 더 높은 효소 활성을 보였다. 이는 효소 혼합처리에 의한 펄프 물성 변화에서 endoglucanase가 endoxylanase보다 더 큰 영향을 지니기 때문으로 판단된다.

효소 전처리 펄프로 CNF를 만들면 효소 단일 전처리 펄프로 제조한 CNF는 무처리 펄프로 제조한 CNF보다 농도 1% 현탁액의 점도가 200 ~ 600 cPs 낮다. 효소 혼합 조건에서는 무처리조건보다 900cPs가량 낮은 현탁액 점도를 지닌 CNF를 만들었지만 중횡비는 그만큼 감소하지는 않는다.

효소 전처리 펄프를 그라인더를 이용하여 CNF를 만들어 추정 중횡비

110~170 사이, 추정 길이 $8\sim 10\mu\text{m}$ 의 CNF를 만들었다. 종횡비는 endoglucanase의 투입량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였다.

효소 전처리 펄프는 고해를 가하면 새로운 물성을 나타낸다. 효소 전처리 펄프는 효소 혼합조건일 때 미세분이 가장 많이 제거되며, 고해 후에는 endoxylanase 투입비가 높은 펄프일수록 미세분이 더 급격히 증가한다. 이는 고해 시 미세분의 발생이 펄프에서 헤미셀룰로오스가 파괴되며 발생하는데, endoxylanase가 더 큰 활성을 보일수록 헤미셀룰로오스 구조가 더 약해져서 쉽게 미세분이 발생한 것으로 판단된다.

무처리 펄프는 15분간 고해하여 250 ml CSF까지 고해하여도 호모게나이저로 분화시 막힘이 발생하지만 효소전처리 펄프는 10분간 고해하여 370ml CSF 조건에서도 호모게나이저 구동이 가능하다.

효소전처리 + 고해 펄프를 이용하여 호모게나이저로 CNF를 제조하였을 때, 주어진 조건하에서 종횡비 120~140 사이, 추정 평균길이 $2\sim 3\mu\text{m}$ 의 CNF를 얻었다. 효소전처리 + 고해 펄프를 이용하여 그라인더로 CNF 제조 시, 효소전처리 펄프로 그라인더를 통해 제조한 CNF보다 더 폭이 크고 짧으며 점도가 높은 CNF 현탁액을 제조하였다.

이상의 연구를 통하여 endoglucanase와 endoxylanase 전처리를 이용한 펄프의 물성 변화와 이러한 효소 전처리가 CNF의 제조에 미치는 영향을 파악할 수 있었으며, 이는 목적에 맞는 CNF 제조에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1. Khalil, H. A., Bhat, A. H., and Yusra, A., I. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review, *Carbohydrate Polymers* 87(2): 963–979 (2012).
2. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., and Bohn, A., cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angew and te Chemie International Edition* 44(22): 3358–3393 (2005).
3. Sakurada, I., Nukushina, Y., and Ito, T., Experimental determination of the elastic modulus of crystalline regions in oriented polymers, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 57(165): 651–660 (1962).
4. Nishino, T., Matsuda, I., and Hirao, K., All-cellulose composite, *Macromolecules* 37(20): 7683–7687 (2004).
5. Zhang, J., Elder, T. J., Pu, Y., and Ragauskas, A. J., Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 69(3): 607–611 (2007).
6. Siró, I., and Plackett, D., Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review, *Cellulose* 17(3): 459–494 (2010).
7. Herrick, F. W., Casebier, R. L., Hamilton, J. K., and Sandberg, K. R., Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. In *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.:(United States)* (Vol. 37, No. CONF-8205234–Vol. 2). ITT Rayonier Inc., Shelton, WA.,

- (1983).
8. Rånby, B. G., Fibrous macromolecular systems. cellulose and muscle. The colloidal properties of cellulose micelles, Discussions of the Faraday Society 11: 158-164 (1951)
 9. Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Brittberg, M., and Gatenholm, P., Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, Biomaterials 26(4): 419-431 (2005).
 10. Brown, A. J., XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose, Journal of the Chemical Society, Transactions 49: 432-439 (1886).
 11. Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., and Isogai, A., cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose, Biomacromolecules 8(8): 2485-2491 (2007).
 12. Sim, K., Youn, H. J., and Jo, Y., Surface modification of cellulose nanofibrils by carboxymethylation and TEMPO-mediated oxidation, Journal of Korea Technical Association of The Pulp and Paper Industry 47(2): 42-52 (2015).
 13. Wanhee Im, Seakho Lee, Hyeonji Park, Hak Lae Lee and Hye Jung Youn, Characteristics of Cellulose Nanofibrils by Carboxymethylation Pretreatment: Effect of the Carboxyl Contents, Journal of Korea Technical Association of the Pulp and Paper Industry 48(6): 195-202 (2016).

14. Pääkkö, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., ... and Lindström, T., Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels, *Biomacromolecules* 8(6): 1934–1941 (2007).
15. Mansfield, S. D., Wong, K. K., De Jong, E., and Saddler, J. N., Modification of Douglas–fir mechanical and kraft pulps by enzyme treatment, *Tappi journal* 79(8): 125–132 (1996).
16. Turbak, A. F., Snyder, F. W., and Sandberg, K. R., Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential, In *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.:(United States)* (Vol. 37, No. CONF-8205234–Vol. 2). ITT Rayonier Inc., Shelton, WA. (1983).
17. Grande, C. J., Torres, F. G., Gomez, C. M., Troncoso, O. P., Canet–Ferrer, J., and Martínez–Pastor, J., Development of self-assembled bacterial cellulose - starch nanocomposites, *Materials Science and Engineering: C* 29(4): 1098–1104 (2009).
18. Zimmermann, T., Pöhler, E., and Geiger, T., cellulose fibrils for polymer reinforcement, *Advanced Engineering Materials* 6(9): 754–761 (2004).
19. Sacui, I. A., Nieuwendaal, R. C., Burnett, D. J., Stranick, S. J., Jorfi, M., Weder, C., and Gilman, J. W., Comparison of the properties of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils isolated from bacteria, tunicate, and wood processed using acid,

- enzymatic, mechanical, and oxidative methods, *ACS Applied Materials and Interfaces* 6(9): 6127–6138 (2014).
20. Iwamoto, S., Lee, S. H., and Endo, T., Relationship between aspect ratio and suspension viscosity of wood cellulose nanofibers, *Polymer Journal* 46(1): 73–76 (2014).
21. Nogi, M., Iwamoto, S., Nakagaito, A. N., and Yano, H., Optically transparent nanofiber paper, *Advanced Materials* 21(16): 1595–1598 (2009).
22. Jonoobi, M., Harun, J., Mathew, A. P., and Oksman, K., Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion, *Composites Science and Technology* 70(12): 1742–1747 (2010).
23. Stelte, W., and Sanadi, A. R., Preparation and characterization of cellulose nanofibers from two commercial hardwood and softwood pulps, *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48(24): 11211–11219 (2009).
24. Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M., Bleaching with enzymes. In *Proceedings of 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* STFI, Stockholm (pp. 67–9) (1986).
25. Bajpai, P., Application of enzymes in the pulp and paper industry, *Biotechnology Progress* 15(2): 147–157 (1999).

26. McIntosh, S., and Vancov, T., Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment, *Bioresource Technology* 101(17): 6718–6727 (2010).
27. Wang, W., Sabo, R. C., Mozuch, M. D., Kersten, P., Zhu, J. Y., and Jin, Y., Physical and mechanical properties of cellulose nanofibril films from bleached eucalyptus pulp by endoglucanase treatment and microfluidization, *Journal of Polymers and the Environment* 23(4): 551–558 (2015).
28. Wang, W., Mozuch, M. D., Sabo, R. C., Kersten, P., Zhu, J. Y., and Jin, Y., Production of cellulose nanofibrils from bleached eucalyptus fibers by hyperthermostable endoglucanase treatment and subsequent microfluidization, *Cellulose* 22(1): 351–361 (2015).
29. Ramos, L. P., Nazhad, M. M., and Saddler, J. N., Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues, *Enzyme and Microbial Technology* 15(10): 821–831 (1993).
30. Nieves, R. A., Ellis, R. P., Todd, R. J., Johnson, T. J., Grohmann, K., and Himmel, M. E., Visualization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I and endoglucanase I on aspen cellulose by using monoclonal antibody-colloidal gold conjugates, *Applied and Environmental Microbiology* 57(11): 3163–3170 (1991).
31. Teeri, T. T., Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends in Biotechnology* 15(5): 160–167 (1997).

32. Li, X. T., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Yang, S. Q., Feng, W. Y., Fan, J. Y., and Kusakabe, I., Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp, *Bioresource Technology* 96(12): 1370–1379 (2005).
33. van Rantwijk, F., and Sheldon, R. A., Biocatalysis in ionic liquids, *Chem. Rev* 107(6): 2757–2785 (2007).
34. Lee, S. B., Kim, I. H., Ryu, D. D., and Taguchi, H., Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism, *Biotechnology and Bioengineering* 25(1): 33–51 (1983).
35. Lei, X., Lin, L., and Li, K., Effect of xylanase pretreatment of wood chips on fiber separation in the CTMP refining process, *BioResources* 3(3): 801–815 (2008).
36. Hassan, M. L., Bras, J., Hassan, E. A., Silard, C., and Mauret, E., Enzyme-assisted isolation of microfibrillated cellulose from date palm fruit stalks, *Industrial Crops and Products* 55: 102–108 (2014).
37. Gourlay, K., van der Zwan, T., Shourav, M., and Saddler, J., The potential of endoglucanases to rapidly and specifically enhance the rheological properties of micro/nanofibrillated cellulose, *Cellulose* 25(2): 977–986 (2018).
38. Seth, R. S., The measurement and significance of fines, *Pulp and*

Paper Canada 104(2): 41-44 (2003).

39. Leopold, B., Consolidation of the paper web, BP and BMA, Tech. Sec., London, p87, (1966).
40. Ryu, J. H., Fundamental properties of nanofibrillated cellulose in suspension and mat states, Ph.D. Thesis, Seoul National University, 1-182 (2013).
41. Murashima, K., Kosugi, A., and Doi, R. H., Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation, *Journal of Bacteriology* 185(5): 1518-1524 (2003).

Abstract

Effect of endoglucanase and endoxylanase on characteristics of pulp and production of cellulose nanofibrils

Lee seek ho

Program in Environmental Materials Science

Department of Forest Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Cellulose nanofibrils(CNF) has width narrower than 100 nm and has a few μm length, especially made with mechanical method. CNF is attractive material, because it has high specific tensile modulus, low coefficient of heat expansion, high specific surface area, environmental friendly, and bio-degradable.

CNF is made by nanofibrillating 1 ~ 2% pulp suspension, giving strong mechanical shear to pulp solution. but, this method needs a lot of energy, there has been a lot of demands to lower this energy consumption. In this study, we used endoglucanase and endoxylanase to hydrolysis pulp in various mixture ratio. endoglucanase and endoxlanase are known to depolymerize cellulose and hemicellulose, the most abundant material in pulp. Each condition of enzyme-treated pulp were beaten. Fiber length, freeness, water retention value, CED viscosity, chemical compositio and crystallinity of each pulp before and after beating were measured. grinder and homogenizer were used to make CNF with each treated pulp. width, aspect ratio, viscosity of suspension of each condition of CNF were

measured.

Enzyme-treated pulp had lower fines than control, and in the endoglucanase and endoxylanase mix used condition, fines content were much lower than condition only a endoenzyme was treated. but, after beating, in more endoxylanase used condition, more than 3 times fines generated than control.

In freeness, WRV, and CED viscosity, condition using endoglucanase and endoxylanase mix showed bigger change in results than that of control or only endoenzyme-treated condition.

Experiments were done in pH 6 and pH 7, because endoglucanase and endoxylanase have different active pH area. each results showed that enzyme activity in pH 7 was higher than that of pH 6, and it seems that it was due to that activity of endoglucanase is more critical than endoxylanase when using endoglucanase and endoxylanase together.

CNF suspension that has lower suspension viscosity than that of control CNF was obtained by using enzyme treated pulp. Using pulp treated with endoglucanase and endoxylanase together produced CNF having about 80% lower suspension viscosity than that of control, and it seems that it is due to synergy between endoglucanase and endoxylanase. it is expected that this low viscosity CNF can be used in CNF application in industry.

CNF was obtained by 30 pass of grinding with control pulp, on the other hands, endoglucanase - endoxylanase-treated pulp was nanofibrillated with only 18 pass of grinding. and as more endoglucanase used, CNF showed lower aspect ratio. this results suggest that using enzyme treatment is helpful to get lower energy consumption and to control morphology or characteristics of CNF.

keywords : Pulp, Cellulose nanofibrils, Enzyme, Beating, Endoglucanase, Endoxylanase

Student Number : 2016 - 26845

감사의 글

정말 짧은 시간이었습니다. 지난 이년간 기본적인 것들부터 배워나가며 저의 모자란 점들을 깨우치고 실험하기 바쁜 날들이었습니다. 그러나 훌륭한 교수님들과 멋진 선배, 후배님들, 그리고 함께 입학하여 동고동락한 대학원 동기님들이 함께 해주셨기 때문에 참으로 유익하고 감사한 시간이었습니다. 이 모든 것들을 지지해주신 부모님과 제 지도교수이신 윤혜정교수님, 그리고 다른 모든 분들께 감사인사를 드립니다.

항상 저에게 사랑과 관심을 아끼지 않아주신 아버지와 어머니가 계셨기에, 그리고 물건을 항상 깨끗하게 반납하지 않는 여동생이 있어서 피곤함을 덜며 지난 시간들을 버텨올 수 있었습니다. 항상 우리 가족이 건강하고 행복하길 기원합니다.

항상 잘 모른다고 하시지만 다 알고계신 윤혜정교수님과 정말 신사다우시면서 유머가 넘치시는 이학래교수님의 식견과 생각을 나눠들을 수 있었음에 감사합니다. 당신들의 수업 뿐만 아니라 매일매일 저녁 식사시간마다 밥상머리에서 이야기를 나눠듣는것들은 저에게 큰 기쁨이었습니다. 교수님들의 가르침을 잊지 않고, 앞으로도 항상 감사의 마음을 안고 올바르게, 부끄러움 없이 살아가도록 노력하겠습니다.

우리 잘생긴 희태야. 네가 있어서 마음편히 힘든 일들을 하소연하며 버텨올 수 있었어. 지난 이년간 함께 해줘서 정말 고마워. 너와 현지가 있었기에 잘 버텨낼 수 있었어. 취업 축하하고 앞으로 모든 일들이 잘 되기를 바라. 귀염둥이 현지야. 나의 장난을 다 받아줘서 고마워. 그리고 귀염둥이 현지야. 나의 과한 장난을 받느라 힘들었지? 앞으로는 내가 없으니 더 편한 마음으로 학업에 정진할 수 있을것이라 믿어.(누가 또 이렇게 장난을 치겠니.) 우리방의 부끄러움 많은 랩장 신영아, 그리고 똑똑한 막내 심엽아... 파이팅. 그리고 우리 왕누나 희내누나! 누나가 계시니 우리 연구실이 흔들리지 않고 잘 운영될 것을 저는 알고있습니다. 다음에 꼭 사과파이 사올게요.

제곤이형. 형 오랜만에 뵈었을 때, 제가 기억하던 형과 너무 많이 달라져서 어색했던거 알아요? 오랜만에 돌아온 학교에 형이 있어서 편했네요. 형 결혼식에 참가하려고 기다리고 있습니다. 어서!

규덕이형. 주말에도 나와서 불철주야 연구하는 형이 있어서 참 많은 의지가 되었습니다. 완희형, 완주가 얼마 안남으셨는데 잘 마무리 되실 바라요. shen, and araz, it was really nice to meet you. let's see again! 그리고 가깝고도 먼 지홍이, 수진이! 항상 일을 똑부러지게 잘 하니까 뜻하는 바가 잘 이뤄지리라 믿어.

지원이형...준호형...용건이형. 그리고 다른 선배님들. 항상 반갑고, 감사하고, 앞으로도 잘 부탁드립니다. 그리고 다른 6층의 후배님들. 만나서 반가웠고 다음에 또 만나요.

불쌍한 중생을 어여뻐 여겨주신 에스더 선배님, 충희형, 영택이형, 용민이형, 경화누나, 애영누나, 수현이와 다른 배문 서문 선후배 동기님들, 그리고 병준이형, 영환이형, 지은누나와 방형, 광직이형, 잭형, 훈형, 정호를 비롯한 바둑부 선후배 동기님들. 항상 관심을 갇어주셔서 감사합니다. 죽는소리 할 곳이 있어서 제가 버틸수 있었습니다. 항상 잊지 않고 기억하고있겠습니다.

서로 누가누가 더 불행한가 이야기하던 친구들아. 행복해지자.

긴 시간이 지났음에도 인간미 넘치시는 최인규 교수님, 우췌빛깔 여환명교수님, 항상 바쁘신 김현중교수님, 그리고 잘생긴 오정권교수님. 교수님들이 계셔서 우리 과의 내일이 오늘보다 더 빛날 것을 믿습니다.

그러니 앞으로 다가올 날들 속에서 부끄러운 사람이 되지 않도록, 처음과 같이 언제나 항상 바르게 살아갈 수 있도록 의심하고 질문을 던지고 반성하며 살겠습니다.